DANIELA HIGASHI

**Modulação do biofilme de *Porphyromonas gingivalis*
pela associação com *Streptococcus gordonii*
e com *Prevotella intermedia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

DANIELA HIGASHI

**Modulação do biofilme de *Porphyromonas gingivalis*
pela associação com *Streptococcus gordonii*
e com *Prevotella intermedia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Rodrigues

Versão corrigida.

A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB, quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Higashi, Daniela.

Modulação do biofilme de *Porphyromonas gingivalis* pela associação com *Streptococcus gordonii* e com *Prevotella intermedia* / Daniela Higashi. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato.

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

Versão do título para o inglês: Modulation of *Porphyromonas gingivalis* biofilm by association with *Streptococcus gordonii* and with *Prevotella intermedia*.

1. *Porphyromonas gingivalis* 2. Biofilme 3. Coagregação 4. *Streptococcus gordonii* 5. *Prevotella intermedia* 6. Endotelial I. Simionato, Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0189/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniela Higashi.

Título da Tese: Modulação do biofilme de *Porphyromonas gingivalis* pela associação com *Streptococcus gordonii* e com *Prevotella intermedia*.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 18 de junho de 2009.

PARECER 900/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 96ª reunião realizada em 16.06.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Expressão de genes de Porphyromonas gingivalis associados à aquisição de ferro em diferentes condições experimentais*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado** por esta Comissão.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **16 de junho de 2010**.

Atenciosamente,

Prof. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO EM PESQUISA

Decl. CEP SH. 020/2014.

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao PARECER 900/CEP, de 18 de junho de 2009, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Modulação do biofilme de Porphyromonas gingivalis pela associação com Streptococcus gordonii e com Prevotella intermedia* " não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 26 de agosto de 2014.

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEP SH- ICB /USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO EM PESQUISA

Decl. CEP SH. 029/2014.

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao PARECER 900/CEP, de 18 de junho de 2009, autorizo a inclusão de linhagens celulares imortalizadas originadas de seres humanos [Human Coronary Artery Endothelial Cells- HCAEC (Lonza)] ao Projeto "*Modulação do biofilme de Porphyromonas gingivalis pela associação com Streptococcus gordonii e com Prevotella intermedia*" não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 17 de setembro de 2014.

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEP SH- ICB / USP

Ao meu esposo Fábio, pelo amor, apoio, companheirismo, paciência e compreensão.

À minha filha Catharina, por encher o meu dia de alegria e felicidades e o meu coração de muito amor e realizações.

Aos meus pais, Dilson e Alice, por sempre acreditarem em mim, por me incentivarem a buscar os meus objetivos, pelo exemplo e amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Maria Regina L. Simionato, pela acolhida, pelo incentivo e conhecimento todos esses anos.

Ao meu co-orientador, Paulo Henrique Rodrigues, por toda ajuda e ensinamentos.

Às minhas colegas de laboratório, Graziela, Luciana, Andréa, Juliana, Melissa, Janaína e ao meu colega Victor, por partilhar o dia-dia, os conhecimentos e as frustrações, por ajudar a tornar essa experiência maravilhosa.

À Prof^ª. Márcia Pinto Alves Mayer, por deixar as portas do seu laboratório sempre abertas para uso dos equipamentos e por tornar esse trabalho possível.

Aos alunos do Laboratório 110, Ellen, Dione, Lucas, Maike, Priscila, Éricka, Pâmela, Sílvia, Marcela, Natália, Vitor, Mari, Juliana, por sempre me receberem de braços abertos, me ajudando sempre que foi preciso e às alunas dos laboratórios de Genética de Microrganismos Taís e Cecília.

Aos técnicos do laboratório, Léo e João, por todo suporte. Tadeu, Norma, Íris

Aos Prof. Silvana Cai, Elisabeth José Vicente, Andréa Balan e Márcio por disponibilizarem o uso dos seus laboratórios, e a seus funcionários, Norma, Tadeu e Íris.

Às secretárias, Alice e Gisele, pela ajuda com a burocracia.

Aos meus irmãos, Denise e Danilo, companheiros e incentivadores do meu trabalho.

À minha querida sobrinha Mariana, por tornar nossa família ainda mais completa.

Aos meus sogros e às minhas cunhadas pelo suporte com os cuidados com a Catharina

A todos os meus primos, tios e amigos por tornar a minha vida maravilhosa.

RESUMO

Higashi D. Modulação do biofilme de *Porphyromonas gingivalis* pela associação com *Streptococcus gordonii* e com *Prevotella intermedia*. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Porphyromonas gingivalis, um bacilo Gram negativo anaeróbio, tem sido associado com o início e progressão da doença periodontal. Possui vários fatores de virulência envolvidos na colonização supra e subgingival, na perturbação das defesas do hospedeiro e na destruição tecidual. Na bolsa periodontal, *P. gingivalis* é encontrado em biofilmes de múltiplas espécies, dentre elas *Streptococcus gordonii* e *Prevotella intermedia*. A habilidade de um patógeno colonizar e proliferar é essencial para o estabelecimento de um processo infeccioso. No hospedeiro, o ferro geralmente se encontra ligado a complexos de heme proteínas, incluindo hemoglobina, lactoferrina e transferrina que podem ser usados como fontes de ferro. Assim, *P. gingivalis* possui sistemas eficientes de aquisição de ferro para capturar este íon de ambientes em condições limitantes. Este estudo se propôs a investigar o comportamento de cepas padrão de *P. gingivalis* e mutantes de genes selecionados em estudos prévios (possível receptor dependente de TonB - PGN0741/PG0637 - e fator de Von Willebrand tipo A - *fvW* - PGN0531/PG1380) em associação com *S. gordonii* e *P. intermedia*, na adesão/invasão de células endoteliais e na formação de biofilme em condições limitantes de ferro. Os ensaios mostraram que o mutante Pg33277Δ0741 apresentou taxas de autoagregação e coagregação com *P. intermedia* superiores e menor biomassa no biofilme misto, enquanto PgW83Δ0637 apresentou maior biomassa e menor autoagregação que a cepa selvagem *P. gingivalis* W83. Pg33277Δ0531 apresentou taxas de autoagregação e coagregação com *P. intermedia* superiores e biomassa inferior à *P. gingivalis* ATCC33277, enquanto que PgW83Δ1380 não apresentou diferenças na autoagregação e biomassa com *P. gingivalis* W83. Porém, a coagregação com *P. intermedia* foi menor que em *P. gingivalis* W83. A coagregação de *S. gordonii* com as linhagens mutantes não apresentou diferenças em relação às cepas selvagens. O receptor dependente de TonB foi importante para *P. gingivalis* ATCC33277, independente da concentração e exaustão prévia de ferro, e tempo de formação de biofilme, mas para *P. gingivalis* W83 essa relevância não ficou evidente. A influência da concentração de ferro para os mutantes *fvW* foi mais evidente em *P. gingivalis* ATCC33277 do que em *P. gingivalis* W83. Os ensaios de invasão demonstraram que *fvW* foi importante para a adesão e persistência de *P. gingivalis* W83 em HCAEC. No entanto, o gene *fvW* só foi importante na adesão em *P. gingivalis* ATCC33277 em HCAEC. As linhagens mutantes apresentaram diferentes comportamentos nos experimentos realizados, enfatizando a importância de usar várias linhagens de *P. gingivalis* em estudos para melhor compreensão do papel de genes em *P. gingivalis*.

Palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis*. Biofilme. Coagregação. *Streptococcus gordonii*. *Prevotella intermedia*. Endotelial.

ABSTRACT

Higashi D. Modulation of *Porphyromonas gingivalis* biofilm by association with *Streptococcus gordonii* and with *Prevotella intermedia*. [Ph. D. thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Porphyromonas gingivalis, a Gram negative anaerobic rod has been associated with the onset and progression of periodontal disease. *P. gingivalis* has several virulence factors involved in supra and subgingival colonization, in disrupting host defenses and causing host tissue damage. In the periodontal pocket *P. gingivalis* is found in complex biofilms associated with other microorganisms such as *Streptococcus gordonii* and *Prevotella intermedia*. The ability of a pathogen to colonize and proliferate is essential for the establishment of an infectious process. In the host iron is found mostly in heme proteins, including hemoglobin, lactoferrin and transferrin which can be used as iron source. Therefore, *P. gingivalis* have developed efficient mechanisms for the acquisition of heme under iron-limiting environments. Thus, this study aimed to investigate the behavior of *P. gingivalis* strains and mutants of selected genes in early studies (TonB dependent receptor - PGN0741/PG0637 and von Willebrand factor Type A -PGN0531/PG1380) in association with *S. gordonii* and *P. intermedia*, in the adhesion and invasion of endothelial cells, and in biofilm formation under limiting iron environment. We found that Pg33277Δ0741 showed higher autoaggregation and coaggregation with *P. intermedia* and lower biomass in mixed biofilm than *P. gingivalis* ATCC33277, while PgW83Δ0637 showed higher biomass and lower autoaggregation than *P. gingivalis* W83. Pg33277Δ0531 demonstrated higher autoaggregation and coaggregation with *P. intermedia* and lower biomass than *P. gingivalis* ATCC33277, while PgW83Δ1380 showed no difference in autoaggregation and biofilm biomass compared to *P. gingivalis* W83. But, the coaggregation with *P. intermedia* was lower than *P. gingivalis* W83. There was no difference between wild type and mutants in coaggregation with *S. gordonii*. TonB dependent receptor was important for *P. gingivalis* ATCC33277 biofilms, independently of hemin concentration, hemin previous exhaustion and time of biofilm formation. But, for *P. gingivalis* W83 it was unclear. The influence of hemin concentration for vWf mutants was more evident for *P. gingivalis* ATCC33277 than for *P. gingivalis* W83. The invasion assays showed that gene vWf was important for adhesion and persistence of *P. gingivalis* W83 in HCAEC. However, gene vWf was important only for adhesion to HCAEC for *P. gingivalis* ATCC33277. The mutant strains showed different behavior in the experiment assays, emphasizing the importance of using several *P. gingivalis* strains in a study for a better understanding of the role of a gene of *P. gingivalis*.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*. Biofilm. Coaggregation. *Streptococcus gordonii*. *Prevotella intermedia*. Endothelial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto da eletroforese em gel de agarose confirmando a inserção dos fragmentos A e B para o gene PGN0741/PG0637 no vetor de clonagem pPR-UF1, digerido com as enzimas de restrição Pvu I e Eco RV, gerando fragmentos de 2,5 kb, 2,4 kb, 0,5 e 0,4kb.....	44
Figura 2 - Foto da eletroforese em gel de agarose confirmando a mutação nas cepas de <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e W83 (vermelho) para o gene PGN0741/PG0637 e as bandas controle e mutação fita simples (amarelo).....	45
Figura 3 - Crescimento de <i>P. gingivalis</i> em diferentes condições e concentrações de hemina ao longo do tempo. (A) <i>P. gingivalis</i> ATCC33277, (B) <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 com ferro exaurido e (C) Pg33277Δ0741.	46
Figura 4 - Quantificação da biomassa (A_{490nm}) dos monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ0637, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0741 oriundas de cultivo normal e de cultivo com uma passagem sem hemina (exaurido) e suspensão em diferentes concentrações de hemina, após 24h, 48h, 72h e 96h. A) Normal Sem Hemina; B) Exaurido Sem Hemina; C) Normal 1 µg/ml hemina; D) Exaurido 1 µg/ml hemina; E) Normal 5 µg/ml hemina; F) Exaurido 5 µg/ml hemina; G) Normal 15 µg/ml hemina; H) Exaurido 15 µg/ml hemina.	48
Figura 5 - Quantificação da biomassa (A_{490nm}) dos monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ1380, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0531, oriundas de cultivo normal e de cultivo com uma passagem sem hemina (exaurido) e suspensão em diferentes concentrações de hemina, após 24h, 48h, 72h e 96h. A) Normal Sem Hemina; B) Exaurido Sem Hemina; C) Normal 1 µg/ml hemina; D) Exaurido 1 µg/ml hemina; E) Normal 5 µg/ml hemina; F) Exaurido 5 µg/ml hemina; G) Normal 15 µg/ml hemina; H) Exaurido 15 µg/ml hemina.	51
Figura 6 - Capacidade de autoagregação e coagregação das cepas de <i>P. gingivalis</i> W83 e PgW83Δ0637, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0741, ao longo do tempo (T0 – T6), com <i>S. gordonii</i> DL1.	52
Figura 7 - Capacidade de autoagregação e coagregação das cepas de <i>P. gingivalis</i> W83 e PgW83Δ0637, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0741, ao longo do tempo (T0 – T6), com <i>P. intermedia</i> 17.	53
Figura 8 - Capacidade de autoagregação e coagregação das cepas de <i>P. gingivalis</i> W83 e PgW83Δ1380 <i>P. gingivalis</i> ATCC33277, Pg33277Δ0531, ao longo do tempo (T0 – T6), com <i>S. gordonii</i> DL1.	56
Figura 9 - Capacidade de autoagregação e coagregação das cepas de <i>P. gingivalis</i> W83 e PgW83Δ1380 <i>P. gingivalis</i> ATCC33277, Pg33277Δ0531, ao longo do tempo (T0 – T6), com <i>P. intermedia</i> 17.	56
Figura 10 - Quantificação (A_{490nm}) da biomassa do biofilme de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ0637, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277, Pg33277Δ0741 com <i>S. gordonii</i> DL1, ao longo do tempo.	60
Figura 11 - Quantificação (A_{490nm}) da biomassa do biofilme de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ0637, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277, Pg33277Δ0741 com <i>P. intermedia</i> 17, ao longo do tempo.	62
Figura 12 - Quantificação (A_{490nm}) da biomassa do biofilme de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ1380, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277, Pg33277Δ0531 com <i>S. gordonii</i> DL1, ao longo do tempo.	64
Figura 13 - Quantificação (A_{490nm}) da biomassa do biofilme de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ1380, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277, Pg33277Δ0531 com <i>P. intermedia</i> 17, ao longo do tempo.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes de <i>P. gingivalis</i> selecionados para serem investigados por PCR quantitativo (RT-qPCR) e seus iniciadores.....	31
Tabela 2 - Iniciadores utilizados para a construção e confirmação das linhagens mutantes PGN0741/PG0637 em <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e <i>P. gingivalis</i> W83	33
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a construção e confirmação das linhagens mutantes PGN0531/PG1380 em <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e <i>P. gingivalis</i> W83.....	33
Tabela 4 - Iniciadores utilizados para a realização do RT-qPCR	40
Tabela 5 - Genes de <i>P. gingivalis</i> expressos diferencialmente durante a formação de biofilme com <i>S. gordonii</i> oposto ao monobiofilme durante os estágios iniciais da formação de biofilme	42
Tabela 6 - Porcentagem de autoagregação e de coagregação, das cepas de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ0637, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0741. Autoagregação (A), com <i>S. gordonii</i> DL1 (B) e <i>P. intermedia</i> 17 (C), após 6 horas de contato	53
Tabela 7 - Porcentagem de autoagregação e de coagregação, das cepas de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ1380, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0531. Autoagregação (A), com <i>S. gordonii</i> DL1 (B) e <i>P. intermedia</i> 17 (C), após 6 horas de contato	57
Tabela 8 - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações dos monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ0637, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0741 com <i>S. gordonii</i> DL1, ao longo do tempo. Significância: valor $p < 0,05$	60
Tabela 9 - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações dos monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ0637, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0741 com <i>P. intermedia</i> 17, ao longo do tempo. Significância: valor $p < 0,05$	62
Tabela 10 - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações dos monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ1380, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0531 com <i>S. gordonii</i> DL1, ao longo do tempo. Significância: valor $p < 0,05$	64
Tabela 11 - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações dos monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> W83, PgW83Δ1380, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0531 com <i>P. intermedia</i> 17, ao longo do tempo. Significância: valor $p < 0,05$	66
Tabela 12 – Quantificação relativa (número de vezes) das cepas de <i>P. gingivalis</i> em ensaios de interação total, invasão e persistência em células endoteliais da artéria coronária humana	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

PMN – leucócitos polimorfonucleares

IL – interleucina

KB – queratinócitos

HCAEC – Human Coronary Artery Endothelial Cells (Células Endoteliais da Artéria Coronária Humana)

EPS - substâncias poliméricas extracelulares

fvW – Fator de Von Willebrand tipo A

TSA – Ágar de soja tríptica

TSAY - Ágar de soja tríptica enriquecido com extrato de levedura, hemina e menadiona

TSB – Caldo de soja tríptica

TSBY – Caldo de soja tríptica enriquecido com extrato de levedura, hemina e menadiona

DO₆₀₀ – Densidade ótica 600 nm

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

RNA – ácido ribonucleico

DNA – ácido desoxirribonucleico

ng – nanograma

μl – microlitros

μg – micrograma

M – Molaridade

rRNA – RNA ribossomal

A₄₉₀ – Absorbância 490 nm

dp – desvio padrão

O/N – over night

S – Svedberg

rpm – rotações por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

Fe – Ferro
Mg –Magnésio
Cl – Cloro
Na – Sódio
Ca – Cálcio
S – Enxofre
O – Oxigênio
K – Potássio
H – Hidrogênio
P – Fósforo
C – Carbono

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Condições de cultivo e cepas empregadas no estudo	29
3.2 Determinação do perfil de expressão gênica de <i>P. gingivalis</i> em biofilme com <i>S. gordonii</i>	29
3.2.1 Formação de biofilme misto	29
3.2.2 Transcrição Reversa e PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)	30
3.3 Metodologia de construção das linhagens mutantes de <i>P. gingivalis</i>	32
3.4 Determinação das concentrações limitantes, adequadas e de excesso de ferro	33
3.5 Formação de monobiofilme de cepas padrão de <i>P. gingivalis</i> W83, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes em diferentes concentrações de ferro, ao longo do tempo	34
3.6 Coagregação de <i>P. gingivalis</i> W83, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes com <i>S. gordonii</i> DL1 e com <i>P. intermedia</i> 17	35
3.7 Formação de biofilme misto de <i>P. gingivalis</i> W83, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes com <i>S. gordonii</i> DL1 e com <i>P. intermedia</i> 17, ao longo do tempo	36
3.8 Determinação da capacidade de adesão, invasão e persistência de <i>P. gingivalis</i> a células endoteliais da artéria coronária humana (HCAEC)	37
3.8.1 Extração de DNA	38
3.8.2 PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Determinação do perfil de expressão gênica de <i>P. gingivalis</i> em biofilme com <i>S. gordonii</i>	42
4.2 Construção das linhagens mutantes de <i>P. gingivalis</i>	44
4.3 Determinação das concentrações limitantes, adequadas e de excesso de ferro	45

4.4 Formação de monobiofilme de cepas padrão de <i>P. gingivalis</i> W83, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes em diferentes concentrações de ferro, ao longo do tempo.....	47
4.5 Coagregação de <i>P. gingivalis</i> W83, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes com <i>S. gordonii</i> DL1 e com <i>P. intermedia</i> 17.....	52
4.6 Formação de biofilme misto de <i>P. gingivalis</i> W83, <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes com <i>S. gordonii</i> DL1 e <i>P. intermedia</i> 17, ao longo do tempo	57
4.7 Determinação da capacidade de adesão, invasão e persistência de <i>P. gingivalis</i> a células endoteliais da artéria coronária humana (HCAEC).....	68
5 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE A - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações entre os monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0741, nas diferentes concentrações de hemina (sem hemina, 1 µg/ml, 5 µg/ml e 15 µg/ml), e nos diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Significância valor $p < 0.05$	86
APÊNDICE B - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações entre os monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 e Pg33277Δ0531, nas diferentes concentrações de hemina (sem hemina, 1 µg/ml, 5 µg/ml e 15 µg/ml), e nos diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Significância valor $p < 0.05$	87
APÊNDICE C - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações entre os monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> W83 e PgW83Δ0637, nas diferentes concentrações de hemina (sem hemina, 1 µg/ml, 5 µg/ml e 15 µg/ml), e nos diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Significância valor $p < 0.05$	88
APÊNDICE D - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações entre os monobiofilmes de <i>P. gingivalis</i> W83 e PgW83Δ1380, nas diferentes concentrações de hemina (sem hemina, 1 µg/ml, 5 µg/ml e 15 µg/ml), e nos diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Significância valor $p < 0.05$	89
ANEXO – Termo de consentimento livre e esclarecido	90

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma doença inflamatória crônica destrutiva que ocorre como resultado de ações complexas de bactérias periodontais (Amano, 2003). A inflamação gengival pode ser associada a 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), principalmente de bactérias Gram negativas que promovem ou induzem respostas inflamatórias nos tecidos periodontais (Darveau et al., 2010; Holt, Ebersole, 2005). Espécies como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* são consideradas periodontopatógenos (Haffajee, Socransky, 1994; Socransky et al., 1998), além de diversas espécies não cultiváveis (Griffen et al., 2012; Paster et al., 2001).

Mais 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). Recentes avanços no campo de pesquisa das doenças periodontais propõem um novo modelo de patogênese que postula que a periodontite é iniciada por uma comunidade microbiana desbiótica e com atividade sinérgica (Hajishengallis, Lamont 2012; Jiao et al., 2014). Nesse modelo, os autores propõem que, microrganismos isoladamente promoveriam poucas alterações no sistema imune e tecidos hospedeiros, estes microrganismos podem, então, se associar e ainda assim conviver em harmonia com o hospedeiro, no entanto, a colonização de um patógeno chave, como por exemplo *P. gingivalis*, levaria à formação da comunidade desbiótica patogênica. Esta comunidade teria o potencial de desregular o sistema imune, alterar a composição da comunidade, levando ao aumento da expressão de fatores de virulência com consequente rompimento da homeostase (Hajishengallis, Lamont 2012). Identificar os microrganismos considerados patógenos chave da microbiota desbiótica e os patógenos acessórios são um dos principais desafios da comunidade científica no momento. Além disso, a identificação de patógenos acessórios e suas relações com aqueles que são considerados chave para a

comunidade desbiótica na periodontite poderá oferecer novos alvos para a intervenção terapêutica das doenças periodontais.

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 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, que lhes proporcione vantagens nutricionais e trocas simbióticas. Posteriormente os biofilmes se desenvolvem de forma tridimensional, como edifícios, mas seus componentes podem se destacar e voltar ao estilo de vida livre até encontrar outro ambiente para se estabelecer (Watnick, Kolter, 2000).

O biofilme dental é uma estrutura organizada que apresenta diferenças tanto estruturais quanto na composição bacteriana. De acordo com Amano (2010) a localização do dente na arcada, o local para o qual a face está voltada e o estágio de formação são considerados fatores importantes nos aspectos ecológico e de potencial patogênico. Estudos relatam que o biofilme dental passa por uma progressão de organismos sendo os estreptococos os pioneiros seguidos pelo aparecimento de actinomicetos e ocasionalmente se convertendo para um biofilme maduro onde a prevalência é de bactérias Gram-negativas anaeróbias (Marsh, 2004, 2006; Periasamy, Kolenbrander, 2009; Rosan, Lamont, 2000; Socransky, Haffajee, 2005). Uma das características mais importantes do biofilme oral de humanos é a elevada diversidade que ocorre graças à alta capacidade de coagregação entre as bactérias orais (Kolenbrander, 1989).

Evidências indicam que a aderência bacteriana às mucosas e superfícies dentais e o processo de coagregação entre as espécies consistem em etapas fundamentais para a colonização da cavidade oral e estabelecimento da comunidade microbiana (Asikainen, Chen, 1999; Darveau et al., 1997; Kolenbrander, 2011; Marcotte, Lavoie, 1998; Wright et al., 2013). Deve-se considerar ainda que a primeira etapa de formação do biofilme oral consiste na aderência dos microrganismos a um substrato e as características coagregativas podem exercer papel fundamental neste arranjo. Portanto, estas interações podem estabelecer relações sinérgicas ou de competição entre os componentes da microbiota associada ao biofilme (Kolenbrander, 1988; Levesque et al., 2003; Socransky, Haffajee, 2002). Tanto a coagregação quanto a autoagregação, que acontece entre bactérias da mesma linhagem,

são eventos importantes e específicos para a formação do biofilme dental (Cisar et al., 1979; Shen et al., 2005). Diversos mecanismos permitem essa associação, mas a maioria delas depende de lectinas presentes nas adesinas bacterianas e carboidratos presentes nos receptores do hospedeiro (McIntire et al., 1978). Na literatura há extensas revisões, principalmente do grupo do pesquisador Kolenbrander, descrevendo a coagregação entre as bactérias orais (Kolenbrander, London, 1993; Kolenbrander et al., 2006; Rickard et al., 2003).

A coagregação ou coadesão contribui para a formação do biofilme por duas vias distintas, mas que são importantes e contribuem para a sucessão ecológica do biofilme. A primeira via ocorre quando células planctônicas reconhecem e aderem a ligantes específicos de células presentes no biofilme, já a segunda ocorre quando colonizadores secundários coagregam, e esse coagregado adere, posteriormente, ao biofilme em desenvolvimento (Rickard et al., 2003).

P. gingivalis, um bacilo Gram negativo anaeróbio, tem sido associado com periodontite crônica (Abiko et al., 2010; Haffajee, Socransky, 1992, 1994) e possui numerosos fatores de virulência que são envolvidos na colonização de sítios supra e subgingivais, perturbação das defesas do hospedeiro e destruição tecidual (Hiramine et al., 2003; Holt et al., 1999; Mysak et al., 2014; Nakayama, 2003; Potempa et al., 2000). Dentre eles podemos citar o LPS (Ogawa et al., 1993, 1994), a membrana externa (Lamont, Jenkinson, 1998), a cápsula (Sundqvist et al., 1991), adesão aos tecidos orais (Hamada et al., 1994; Sojar et al., 1999, 2002, 2005), a capacidade de invasão (Lamont et al., 1992; Rodrigues et al., 2012), a aquisição de ferro (Chu et al., 1991; Smalley et al., 2011) e a capacidade de formação de biofilme (Tribble et al., 2013). Essas características, muitas vezes genotípicas, promovem diferenças entre cepas de *P. gingivalis* (Ménard, Mouton, 1995) e se traduzem em padrões de comportamento diversos em relação à colonização (Nakagawa et al., 2002a; Tribble et al., 2013) e comprometimento periodontal (Amano et al., 1997, 2000; Yoshino et al., 2007).

P. gingivalis produz uma grande diversidade de enzimas, como collagenases, hemolisinas e proteases tipo tripsina, cuja atividade é crítica tanto para a sobrevivência deste patógeno como para o início e progressão das doenças periodontais (Hamada et al., 2002; Holt et al., 1999; Katz et al., 2002; Lamont, Jenkinson, 1998; Nakayama et al., 1995; Takeuchi et al., 2001). Além disso, *P. gingivalis* adere a uma variedade de superfícies celulares do hospedeiro (Andrian et al., 2006; Lamont, Jenkinson, 1998; Slots, Gibbons,

1978). Sua capacidade de internalização, especialmente em células epiteliais e endoteliais, é considerada fator significativo para seu potencial patogênico, uma vez que facilita sua sobrevivência nos tecidos periodontais, conferindo nutrição e proteção das defesas do hospedeiro (Bélanger et al., 2012; Deshpande et al., 1998; Lamont et al., 1992; Rodrigues et al., 2012; Tribble, Lamont, 2010).

P. gingivalis coloniza a cavidade bucal principalmente através da coagregação a outros microrganismos previamente aderidos (Cook et al., 1998; Grenier, Mayrand, 1987; Kamaguchi et al., 2003; Kolenbrander et al., 2006; Lamont et al., 1994), no entanto, os mecanismos de colonização de *P. gingivalis* na cavidade oral ainda não estão totalmente compreendidos, merecendo maior número de estudos que esclareçam os fatores que modulam a formação de biofilmes por esta espécie.

Na bolsa periodontal, *P. gingivalis* é encontrado fazendo parte de biofilmes complexos compostos por bactérias de várias espécies. Este patógeno possui capacidade de agregar com outras bactérias, entre elas *Streptococcus gordonii* (Cook et al., 1998; Rosan, Lamont, 2000; Simionato et al., 2006) e *Prevotella intermedia* (Kamaguchi et al., 2003), além de *Streptococcus oralis* (Maeda et al., 2013), *Fusobacterium nucleatum* (Metzger et al., 2009a,b; Polak et al., 2012; Rosen, Sela, 2006), *Prevotella oris* (Sato, Nakazawa, 2012), *Treponema denticola* (Ito et al., 2010) e *Actinomyces viscosus* (Goulbourne, Ellen, 1991; Hiratsuka et al., 1992), entre outros. Os colonizadores iniciais conferem a *P. gingivalis* locais para adesão, substratos essenciais para seu crescimento e tensão reduzida de oxigênio. As ligações são altamente específicas e possuem diferentes mecanismos. Assim, a adesão com *Capnocytophaga ochracea* e *Eubacterium saburreum* se dá através de vesículas extracelulares (Grenier, Mayrand, 1987), com *F. nucleatum* ocorre através de adesina protéica com seu receptor carboidrato em *P. gingivalis* (Kinder, Holt, 1989). As fímbrias e vesículas de *P. gingivalis* podem ainda aderir a *Actinomyces viscosus* (Goulbourne, Ellen, 1991) e com *T. denticola* a interação é bimodal, sendo um dos mecanismos termo sensível e o outro termo estável (Grenier, 1992). A fímbria maior de *P. gingivalis* está envolvida na adesão e início da colonização, enquanto a menor está envolvida na formação de micro colônias e maturação do biofilme (Lin et al., 2006), mas ambas parecem atuar de maneira a regular o biofilme maduro (Enersen et al., 2013).

Dos mecanismos de coagregação e formação de biofilme, um dos mais importantes ocorre entre *P. gingivalis* e *S. gordonii* (Cook et al., 1998; Kuboniwa et al., 2010; Lamont et

al., 2002; Rosan, Lamont, 2000; Simionato et al., 2006), um colonizador inicial do biofilme dental e provavelmente é iniciada na placa supra gengival (Kuboniwa et al., 2010; Lamont et al., 2002). *P. gingivalis* adere à camada de *S. gordonii* previamente aderida a superfícies sólidas, formando estruturas em forma de torres (Cook et al., 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 (Chung et al., 2000; Lamont et al., 1994; Maeda et al., 2004a,b; Park et al., 2005). A interação de 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).

Estudo realizado por Kamaguchi et al. (2003), demonstraram que a coagregação entre *P. gingivalis* e *P. intermedia* parece ser mediada por adesinas codificadas por genes para gengipaínas de *P. gingivalis*. Essa associação parece beneficiar ambas as espécies na aquisição de heme a partir da hemoglobina, através do hemóforo (HmuY) de *P. gingivalis* e da protease interpaína A de *P. intermedia* (Byrne et al., 2013) e está relacionada com o aumento da profundidade de sondagem de sítios periodontais (Nadkarni et al., 2012).

S. gordonii e *P. intermedia* são membros da microbiota subgengival que preenchem vários requisitos para contribuir com o potencial patogênico de *P. gingivalis* e para serem incluídos no pequeno grupo que possui um papel desbiótico especializado dentro da complexa comunidade microbiana e, portanto, merecem ser melhor estudados. Já foi demonstrada maior perda óssea alveolar na associação entre *P. gingivalis* com *S. gordonii* (Daep et al., 2011). De acordo com os novos conceitos de desbiose envolvendo a etiologia e patogênese das doenças periodontais, a virulência de patógenos periodontais como *P. gingivalis* adquire importância apenas no contexto de uma comunidade microbiana

sinérgica, a qual é requerida para a expressão da patogenicidade (Hajishengallis, Lamont, 2012).

As adesinas presentes em bactérias Gram negativas podem ser classificadas em adesinas fimbriais e não fimbriais. As primeiras incluem a fímbria, pili, curli e pili do tipo IV, já as não fimbriais envolvem autotransportadores, membrana externa e adesinas secretadas (Amano, 2010). A fímbria principal de *P. gingivalis* possui papel importante na interação que ocorre entre a bactéria e os tecidos do hospedeiro e sua participação na adesão e invasão a determinados sítios é essencial (Lamont, Jenkinson, 2000; Lamont, Yilmaz, 2002). A sequência de *fimA* é única e, de acordo com sua sequência de aminoácidos, é classificada em seis diferentes tipos (tipo I-V e Ib) (Amano et al., 1999, 2000; Nakagawa et al., 2000, 2002b). Muitos estudos tem se empenhado em relacionar a distribuição do genótipo de *fimA* com condição periodontal e região geográfica. O tipo II está mais relacionado com pacientes com periodontite, enquanto os tipos I e III estão relacionados com pacientes com periodonto saudável (Amano et al., 1997, 1999, 2000; Missailidis et al., 2004; Nakagawa et al., 2002b).

A expressão da fímbria maior de *P. gingivalis* parece ser influenciada por condições ambientais, tais como estresse, escassez de ferro, altas temperaturas e condições nutricionais do meio (Amano et al., 1994; Xie et al., 2004). A maturação da fímbria maior de *P. gingivalis*, ocorre pela atuação de gingipaínas arginina-específica (Rgp) (Kadowaki et al., 1998). A fímbria menor de *P. gingivalis* (*mfa1*) também está relacionada com o processo de adesão a células hospedeiras (Umemoto, Hamada, 2003) e na coagregação (Park et al., 2005).

P. gingivalis também possui a capacidade de se ligar a diferentes tipos celulares como macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, mediada pela fímbria, através da interação com $\alpha 5\beta 1$ -integrina, $\beta 2$ -integrina (CD11 / CD18). *P. gingivalis* utiliza a $\alpha 5\beta 1$ -integrina para aderir à superfície celular e subsequentemente entrar na célula (Tsuda et al., 2008). Em estudo realizado com hamster, a fímbria maior de *P. gingivalis* competiu com a fibronectina por sítios de $\alpha 5\beta 1$ -integrina, impedindo a regulação celular da fibronectina/integrina (Nakagawa et al., 2005), assim, parece que a fímbria maior de *P. gingivalis* facilita a adesão de *P. gingivalis* a células hospedeiras e impede a homeostase celular (Amano et al., 2010).

Em estudo de Rodrigues et al. (2012), foram demonstradas diferenças em relação às cepas selvagens de *P. gingivalis* no que diz respeito à capacidade de aderir, invadir e persistir

em células endoteliais de artéria coronária humana (HCAEC), bem como as vias pelas quais as linhagens seguiram após a internalização. Além disso, os autores determinaram as mudanças provocadas nas células após a invasão com *P. gingivalis* através da medição dos níveis de citocinas pró inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão celular solúveis. O estudo mostra que, dependendo da linhagem invasora, os efeitos para as células variam e demonstra que mesmo bactérias de uma mesma espécie podem possuir diferentes genótipos que expressam comportamentos diversos e até mesmo opostos.

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 sangüínea através de atos simples, como mastigar ou falar, e principalmente durante a escovação, levando à bacteremia transitória. Esses periodontopatógenos presentes na corrente sangüínea são capazes de invadir células endoteliais, mediada pela fímbria maior *FimA* (Deshpande et al., 1998) ou induzir agregação plaquetária, considerada um dos marcadores para a formação do ateroma da doença cardiovascular (Kuramitsu et al., 2003).

A doença periodontal tem sido associada com aterosclerose (Lockhart et al., 2012; Trevisan, Dorn, 2010). *P. gingivalis* já foi detectado em lesões ateromatosas por diferentes técnicas, comprovando que a bactéria tem a capacidade de invadir, sobreviver e replicar nesses tecidos (Cavrini et al., 2005; Kozarov et al., 2005; Rafferty et al., 2011; Velsko et al., 2014). No entanto não se pode confirmar uma relação causal entre elas, apesar de já ser conhecida a capacidade da bactéria de aderir e invadir células epiteliais *in vitro* e *in vivo* (Rudney et al., 2005; Yilmaz et al., 2006) e endoteliais *in vitro* (Progulske-Fox et al., 1999; Rodrigues et al., 2012). A presença de bactérias metabolicamente ativas dentro de lesões ateroscleróticas aponta para um efeito direto, o que pode começar como uma disfunção endotelial induzida por infecção, pela produção alterada de óxido nítrico, que também tem um papel central na vasodilatação, inflamação, trombose e imunidade (Allen et al., 2012; Tousoulis et al., 2012; Velsko et al., 2014).

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).

Muitos genes ou fatores tem sido identificados como essenciais para a formação de biofilme (Stoodley et al., 2002), tais como proteínas expostas na superfície, apêndices (pili ou fímbria) e substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Estudos prévios de formação de biofilme entre *P. gingivalis* ATCC33277 e *S. gordonii* DL1, realizados no laboratório de Microbiologia Oral do ICB USP indicaram uma expressão positiva do gene PGN0531 (proteína hipotética, relacionada com o Fator de Von Willebrand Tipo A - Los Alamos Oralgen). Esta evidência sugere uma possível função desta proteína na formação do biofilme como resposta à presença de *S. gordonii*. O gene Fator de Von Willebrand Tipo A, PGN0531 em *P. gingivalis* ATCC33277 e PG1380 em *P. gingivalis* W83, apresenta analogia com a sequência do fator de von Willebrand de *Chlorobium chlorochromatii*. O domínio do fator de von Willebrand é bem conservado e foi encontrado no genoma de arqueas, procariotos e eucariotos (Ponting et al., 1999). Em mamíferos parece estar relacionado com eventos de ligação/adesão dependentes de íons metálicos (Baldwin et al., 1998), mas sua função em procariotos ainda não está esclarecida.

Streptococcus agalactiae é um coco Gram positivo, envolvido com infecções neonatais severas (Gibbs et al., 2004). Em *S. agalactiae*, o pilus funciona como um fator de virulência (Nobbs et al., 2008), essencial para adesão bacteriana aos tecidos hospedeiros, incluindo epitélio (Dramsi et al., 2006) e endotélio (Maisey et al., 2007) e também tem envolvimento nos eventos de coagregação (McIntire et al., 1978). O pilus é formado por três subunidades, Pil A, B e C, onde Pil B é o componente principal, o pilus genuíno, PilC é o componente menor, localizado na base e PilA é uma adesina associada ao pilus, localizada ao longo do seu corpo (Dramsi et al., 2006; Konto-Ghiorgi et al., 2009), onde se localiza o domínio de adesão fator de von Willebrand tipo A (fvW). Em proteínas eucarióticas extracelulares, o fvW medeia a ligação por meio de sítios dependentes de íons metálicos

(MIDAS) e esses cátions divalentes (Mn^{2+} e Mg^{2+}) são capazes de estabilizar o domínio da integrina $\alpha 1\beta 1$ responsável pela adesão ao colágeno (Konto-Ghiorgi et al., 2009). Esses autores demonstraram que o domínio do fvW presente no pilus foi importante para a adesão às células epiteliais, mas não essencial para a formação de biofilme sobre superfícies abióticas, sugerindo que o domínio do fvW reconhece ligantes específicos das células epiteliais.

A aquisição de nutrientes é fundamental para a sobrevivência da bactéria, ela é principalmente realizada por proteases que degradam componentes dos tecidos do hospedeiro, como colágeno, fibronectina, queratina, 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 (Potempa, Travis, 1996). Essa dualidade por um lado leva à atração de PMNs ao sítio infectado e produção local de interleucinas (IL), 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 (Hajishengallis, 2011; Lamont, Jenkinson, 1998). Entre os fatores de virulência de *P. gingivalis* estão as gingipaínas, que são cisteínas proteases extracelulares e produtos de três genes, dois que codificam para genes específicos de Arginina (*RgpA* e *RgpB*), e um que codifica para o gene proteinase Lisina-específico proteinase (*Kgp*) (Potempa et al., 2003). Essas proteases podem aderir ao fibrinogênio, hemoglobina, colágeno tipo IV e laminina (Pathirana et al., 2006; Pike et al., 1996). *RgpA* adere a células epiteliais KB e subsequentemente promove o rompimento entre as células (Chen et al., 2001) e também está associada com a formação de biofilme de *P. gingivalis* (Abe et al., 2004).

A capacidade de um patógeno colonizar e proliferar em um nicho do hospedeiro é essencial para seu estabelecimento e para a progressão do processo infeccioso. Íons de ferro livres são difíceis de obter pelos microrganismos, uma vez que Fe^{3+} é insolúvel em soluções aquosas em pH fisiológico. No hospedeiro o ferro geralmente encontra-se ligado a complexos, sendo que a concentração de ferro livre ($10^{-18}M$ - Bullen et al., 1978) é insuficiente para permitir crescimento bacteriano (Litwin, Calderwood, 1993). Uma

quantidade significativa de ferro é ligada ao heme, um grupo prostético de muitas proteínas biologicamente ativas, como hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalases e peroxidases, envolvidas em vários processos (Wakabayashi et al., 2010). Assim, para alcançar uma homeostase efetiva do ferro, microrganismos devem balancear sua necessidade para eficientemente capturar íons de ferro do ambiente a fim de assegurar a manutenção de estoques adequados e ao mesmo tempo prevenir-se contra a toxicidade induzida pelo ferro, uma vez que o excesso desse íon pode ser tóxico para o metabolismo bacteriano (Andrews et al., 2003).

A aquisição de ferro é um fator muito importante na seleção ou favorecimento *in vivo* de *P. gingivalis* na composição da placa subgengival e é importante para o crescimento bacteriano e início e progressão da doença periodontal (Olczak et al., 2012; Simpson et al., 2000). Ao contrário de outras bactérias Gram negativas, *P. gingivalis* não possui sideróforos, usados pela maioria das bactérias para mediar o transporte de íons férricos ou ferrosos complexados na forma de heme. Dessa forma, essa bactéria emprega receptores específicos de membrana externa, proteases como gingipaínas e lipoproteínas para adquirir ferro/heme de fontes exógenas (Olczak et al., 2005; Schifferle et al., 1996) e o ferro/hemina são então transportados da superfície da célula para o citoplasma por um sistema ABC de transporte e permeases de *P. gingivalis* (Slakeski et al., 2000), requerendo uma fonte de energia e uma outra proteína chamada TonB (Chimento et al., 2003; Kadner et al., 1990).

Baseados na análise do sequenciamento do genoma de *P. gingivalis* W83, pelo menos 50 genes foram identificados como possivelmente envolvidos na aquisição de ferro/hemina (Nelson et al., 2003). Em *P. gingivalis* ATCC33277 vários genes são regulados quando seu parceiro de biofilme é *S. gordonii* (Simionato et al., 2006) e poucos deles tem sido investigados com mais atenção. Um dos genes regulados positivamente por essa interação é PGN0741 (possível receptor dependente de TonB – Los Alamos Oralgen). Proteínas de membrana externa ligam-se com alta especificidade a moléculas carreadoras de ferro presentes em concentrações muito baixas e que são muito grandes para serem transportadas através do lúmen das porinas, e as transportam ativamente através da membrana externa. Este processo de transporte ativo requer uma fonte de energia e uma segunda proteína chamada TonB (Chimento et al., 2003). Proteínas de membrana externa ligadas ao transporte ativo interagem com a proteína transperiplasmática TonB por meio de uma sequência conservada, a "Ton-box" (Lundrigan et al., 1986; Schramm et al., 1987). A

interação com TonB provê a energia necessária para a membrana interna realizar o ciclo de transporte ativo através da membrana externa (Kadner et al., 1990).

Estudos moleculares demonstram diferenças entre cepas padrão comumente utilizadas nos estudos de *P. gingivalis* (Igboin et al., 2009; Ménard, Mouton, 1995). Essas diferenças envolvem a presença de cápsula, tipos de gingipaínas (Hall et al., 2005, Nadkarni et al., 2009), presença de transposon (Bacic et al., 2005; Naito et al., 2011), presença de fímbrias maior (FimA) e menor (mfa1), variações na sequência de aminoácidos da fímbria maior (FimA) (Amano et al., 1997; Nakagawa et al., 2002b) e isso pode se traduzir em diferenças nas condições periodontais (Amano et al., 1997, 1999, 2000; Missailidis et al., 2004; Yoshino et al., 2007) e resposta imune à presença da bactéria em ratos (Marchesan et al., 2012) e também no comportamento das cepas aderindo e invadindo tecidos (Nakagawa et al., 2002a; Rodrigues et al., 2012; Tribble et al., 2013; Wang et al., 2009). Levando-se em consideração essas diferenças entre as cepas, acreditamos que os genes selecionados para estudo possam apresentar funções importantes, especialmente em respeito à colonização bucal e eficiência na formação de biofilmes mono e heterotípicos de *P. gingivalis*. O estudo pretende ainda contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de colonização de *P. gingivalis* através da ligação com *S. gordonii* e *P. intermedia*.

OBJETIVOS

- Determinar o perfil de expressão gênica de *Porphyromonas gingivalis* durante os estágios iniciais do biofilme com *Streptococcus gordonii*.
- Construir linhagens mutantes dos genes PGN0741 e PGN0531, em *P. gingivalis* ATCC33277 e dos genes PG0637 e PG1380, em *P. gingivalis* W83.
- Determinar os requerimentos de ferro por *P. gingivalis* e verificar se diferentes concentrações de ferro modulam biofilmes de *P. gingivalis*.
- Verificar a capacidade coagregativa de cepas de *P. gingivalis* e suas linhagens mutantes com *S. gordonii* e *Prevotella intermedia*.
- Quantificar os biofilmes de *P. gingivalis* e suas linhagens mutantes em associação com *S. gordonii* ou *P. intermedia*.
- Avaliar a capacidade de adesão, invasão e persistência das cepas de *P. gingivalis* em células endoteliais da carótida humana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Condições de cultivo e cepas empregadas no estudo

P. gingivalis ATCC33277, Pg33277Δ0741, Pg33277Δ0531, *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637, PgW83Δ1380 e *P. intermedia* 17 foram cultivadas em ágar sangue [Tryptic Soy Agar – TSA (BD Difco, Sparks, Maryland, EUA), suplementado com 5% de sangue de carneiro, extrato de levedura (0,5%) (BD Difco), hemina (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) e menadiona (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich) (TSAY)] e incubadas a 37 °C em câmara de anaerobiose (Coy Lab, Ann Arbor, Michigan, EUA) em atmosfera de 85% N₂, 5% CO₂ e 10% H₂. Culturas em meio líquido foram realizadas em Tryptic Soy Broth (TSB)(BD Difco) suplementado com extrato de levedura, hemina e menadiona (TSBY). *S. gordonii* DL1 foi cultivado a partir do estoque congelado em TSA em condições anaeróbicas, e após crescimento, foi transferido e cultivado em TSB.

3.2 Determinação do perfil de expressão gênica de *P. gingivalis* em biofilme com *S. gordonii*

3.2.1 Formação de biofilme misto

Após cultivo por 16 horas a cultura de *S. gordonii* DL1 foi centrifugada e suspensa em TSBY e sua densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) foi ajustada para 1,0 (equivalente a cerca de 1x10⁸ cfu/ml) em espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburgo, Germany)) e incubada em frascos de cultura de célula T75 (Guangzhou Jet Bio-Filtration Products Co., Ltd, China) por 24 horas em câmara de anaerobiose. Após este período, a fase planctônica foi removida, o biofilme lavado com tampão potássio e fosfato (PBS) para remoção das células não aderidas. Paralelamente, *P. gingivalis* ATCC33277 foi cultivado em TSBY por cerca de 16 horas, centrifugado e suspenso em TSBY em DO₆₀₀ = 1,0 (1x10⁸ cfu/ml), e transferido para o frasco contendo o biofilme pré formado de *S. gordonii* e permaneceu em anaerobiose por 10 e por 40 minutos. Os monobiofilmes de *P. gingivalis* foram gerados de maneira semelhante, exceto pela ausência prévia do *S. gordonii* e foram utilizados como controle para verificar os genes expressos apenas na presença de *S. gordonii*. Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata.

3.2.2 Transcrição Reversa e PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

Baseado em Simionato et al. (2006), após os períodos de incubação, TRIzol (Invitrogen) foi adicionado aos frascos e o RNA foi extraído com clorofórmio, precipitado com isopropanol e lavado com etanol 75% (segundo instruções do fabricante). Após a extração, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen) e purificado utilizando o kit PureLink RNA MiniKit (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). Como controle, todas as amostras foram submetidas a ensaio de PCR com iniciadores específicos para o gene 16S rRNA para confirmar a ausência de DNA nas amostras de RNA. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e sua concentração foi determinada em espectrofotômetro (Spectrophotometer ND1000, Nanodrop, Wilmington, Delaware, EUA). Assim, foram obtidas três amostras independentes de RNA.

A partir de cada amostra de RNA, a transcrição reversa para geração do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 250 ng de RNA, iniciadores randômicos e a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). A transcrição reversa foi realizada por 25 °C por 10 minutos, seguida de uma incubação de 42 °C por 16 horas e da inativação da enzima a 70 °C por 15 minutos. Após a transcrição, o produto foi purificado utilizando o QIquick PCR Purification Kit (Qiagen, Venlo, Limburgo, Países Baixos).

Os ensaios de RT-qPCR foram realizados em iCycler iQ (sistema de detecção em tempo real Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) usando iniciadores específicos (Tabela 1). A seleção dos genes a serem analisados no PCR em Tempo Real foi baseada, em parte, no estudo de Simionato et al., 2006, que analisaram através do microarranjo a expressão diferencial de genes entre biofilme misto de *P. gingivalis* e *S. gordonii* e sua contraparte planctônica. Outros genes foram selecionados em estudo prévio do nosso laboratório (Higashi et al., 2009) que encontrou expressão diferencial nas mesmas condições de Simionato et al., 2006, utilizando Differential Display PCR.

As reações (20 µl) foram realizadas usando 2 µl de produto da transcrição reversa purificado, 1 µl de cada um dos iniciadores 10 µM, 2,4 µl de MgCl₂ 50 mM, 10 µl de Quantimix (Biotools, Madri, Espanha) e 3,6 µl de H₂O. A amplificação e detecção do sinal fluorescente foram obtidas através do programa padrão usando os seguintes parâmetros: 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos com denaturação a 94 °C por 30 segundos e anelamento/ extensão a 60 °C por 45 segundos. Após os 40 ciclos, foi realizada uma curva de

dissociação dos produtos de PCR, com temperatura inicial de 60 °C, aumentando gradativamente 0,4 °C a cada 10 segundos, até a temperatura final de 99,6 °C, para verificar a especificidade dos iniciadores.

Tabela 1 - Genes de *P. gingivalis* selecionados para serem investigados por PCR quantitativo (RT-qPCR) e seus iniciadores.

Número do Locus [§]	Gene	Proteína ou Função	Seqüência dos iniciadores (5'– 3')	Tamanho do produto (pb)
PGN0043	<i>ftsH</i>	Divisão celular, metalopeptidase de zinco ATP-dependente	F CGTCGCAGCATCGCCATCC*	162
PGN0293	<i>ragA</i>	Proteína ragA	R CAGAGCCTCCGTTGTCGTGATC F CAATGGTGTGTGATTATC**	111
PGN0489		Proteína Hipotética	R CTCATAGGCTTCTTACTG F AGAAGAGAGAATCAGATACT**	117
PGN0558	<i>hmuY</i>	Transporte de ferro	R TCATTGGTTGGATTGTGTT F AGAGAAATACTGCCACGTTTCG*	156
PGN0531	<i>fvW</i>	Fator de Von Willebrand Tipo A	R ATCATTTTCTCCGCACTCTGTG F GACAAGCGACCTACTTAA**	151
PGN0567	<i>prtC</i>	Colagenase	R CACATCATCTCCTACAGT F GATAATGGCTCCAGTCGGTTCG**	122
PGN0741		Possível receptor dependente de TonB	R TGGTGAAGTTGTTGGCAGATCG F GTAGGGGTTGTAGGCGGTGAG*	181
PGN1111	<i>fhs</i>	Formato-tetrahidrofolato ligase	R GCTGCTCCTCGTTGGTGAATAC F CGCCACATATACAATCTG*	108
PGN1208	<i>clpB</i>	Proteína ClpB	R GATACAATGCTCACGAAC F CAGGGAAATAGCCGAATCA**	206
PGN2024		Hemaglutinina; N-acetilmuramoi-L-alanina amidase, família 4	R CGATCTCCGTCTCTTCTGC F ATACGAGGCTTATGTGAA**	149
			R CGAAGTGATTGTTGTGTA F GTAGATGACTGATGGTGAAAACC***	
Pg 16S		16S rRNA	R ACGTCATCCCCACCTTCCTC	197

[§] Número do Locus do banco de dados Oral Pathogen Sequence Databases (Los Alamos National Laboratory)

*Simionato et al., 2006.

** Este estudo

*** Tran, Rudney, 1996.

Cada experimento foi realizado com três amostras independentes de RNA em triplicata. Os dados foram obtidos pelo programa Bio-Rad iQ5 Optical System e a partir deles normalizados utilizando os transcritos do gene 16S rRNA. A quantificação relativa entre as condições avaliadas foi realizada através do programa DART-PCR (Peirson et al., 2003) que parte do princípio que a fluorescência da reação é proporcional à concentração de DNA. O test *t* de Student foi usado para calcular a significância da diferença entre as médias de expressão gênica das amostras, conforme descrito por Durso et al. (2014).

3.3 Metodologia de construção das linhagens mutantes de *P. gingivalis*

Os genes PGN0741/PG0637 (possível receptor dependente de TonB) e PGN0531/PG1380 [proteína hipotética (fator de von Willebrand tipo A)] (Oralgen Database *P. gingivalis* ATCC33277/*P. gingivalis* W83) foram selecionados para análise mutacional com base nos resultados do experimento anterior de expressão de *P. gingivalis* em biofilme com *S. gordonii* (Tabela 5). A construção dos mutantes seguiu o protocolo proposto por Bélanger et al. (2007). Foram amplificados dois fragmentos envolvendo as regiões C3' e C5' terminais de cada gene a ser deletado, tanto em *P. gingivalis* W83 como em *P. gingivalis* ATCC33277. Os iniciadores usados continham sequências de enzimas de restrição (Tabelas 2 e 3) previamente selecionadas para possibilitar a inserção dos fragmentos amplificados no plasmídeo pPR-UF1 (Bélanger et al., 2007), que continha o marcador *ermF* que confere resistência à eritromicina. Após a ligação entre os fragmentos e pPR-UF1, o plasmídeo foi eletroporado em *E. coli* DH5 α para permitir a produção de alto número de cópias de plasmídeo. O plasmídeo foi então extraído, digerido e foi realizada uma eletroforese em gel de agarose para confirmar a inserção dos dois fragmentos. Após a confirmação da presença de ambos os fragmentos em pPR-UF1, estes foram linearizados e inseridos em *P. gingivalis* W83 e *P. gingivalis* ATCC33277 por eletroporação. O produto foi plaqueado em TSAY contendo eritromicina (5 μ g/ml), para permitir o crescimento apenas de *P. gingivalis* nas quais o marcador de resistência estava presente. Para diferenciar colônias que possuem a mutação na fita dupla das colônias onde não ocorreu mutação ou onde a mutação foi incompleta (fita simples), foram realizados ensaios de PCR utilizando iniciadores específicos (Tabelas 2 e 3). A confirmação da mutação foi visualizada através de eletroforese e identificada pelo tamanho dos produtos. Uma colônia positiva para a mutação foi selecionada e seu produto de PCR foi seqüenciado para confirmação da mutação. As curvas de crescimento das quatro linhagens mutantes foram semelhantes às curvas das respectivas cepas selvagens de *P. gingivalis* (ATCC33277 e W83).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para a construção e confirmação das linhagens mutantes PGN0741*/PG0637[#] em *P. gingivalis* ATCC33277 e *P. gingivalis* W83.

Iniciador	Sequência 5' - 3'	Sítio de Restrição	Produto
Frag A	F AAAACGCGTCATTGGAGTTTAACCTCGCTGAAAAGC	<i>Mlu I</i>	619bp
	R AAATCTAGACAGAAGGACTTCGATCGTGGAGCTGCA	<i>Xba I</i>	
Frag B	F AAAGGTACCGACAAGGTGTTACCCGTCTTGCTGTCTTT	<i>Kpn I</i>	765bp
	R AAAGAGCTCCGAATCCAAGCCAAAAAGCAGCGAGAGAAC	<i>Sac I</i>	
PCR Y1	F AGCCAATACCCAAGGACGTCAGGAG		935bp
	R CGAGAATATCGTCAACTGTTTACTA		
PCR Y2	F GCCCAATATCTAAAACCGTATCCTG		1302bp
	R CTATCTATGCTTCCAATATAGCTCG		
PCR Y3	F AGCCAATACCCAAGGACGTCAGGAG (Idem PCR Y1F)		1092bp
	R GCTTTTGTACCGAGGCCAATGCAA		

* Número do Locus do banco de dados Oral Pathogen Sequence Databases (Los Alamos National Laboratory) para *P. gingivalis* ATCC33277.

[#] Número do Locus do banco de dados Oral Pathogen Sequence Databases (Los Alamos National Laboratory) para *P. gingivalis* W83.

Bases sublinhadas referem-se ao sítio de restrição de cada enzima (New England Biolabs Inc., Hitchin, Hertfordshire, Inglaterra).

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a construção e confirmação das linhagens mutantes PGN0531*/PG1380[#] em *P. gingivalis* ATCC33277 e *P. gingivalis* W83.

Iniciador	Sequência 5' - 3'	Sítio de Restrição	Produto
Frag A	F AAAGAGCTCGACTTTTGGACATAACCTGG	<i>Sac I</i>	537bp
	R AAAGGTACCTCCGTTTCGGAAAGCGTATGC	<i>Kpn I</i>	
Frag B	F AAAGTCGACTGAATGCGGAATGATACTGT	<i>Sal I</i>	539bp
	R AAAACGCGTATCATTTCGTCAGAATATCGG	<i>Mlu I</i>	
PCR Y	F AGAATCCGGTTTGAAAGATCGAC		3329bp
	R GCACAGGTAGACCGATTTCATGATGA		

* Número do Locus do banco de dados Oral Pathogen Sequence Databases (Los Alamos National Laboratory) para *P. gingivalis* ATCC33277.

[#] Número do Locus do banco de dados Oral Pathogen Sequence Databases (Los Alamos National Laboratory) para *P. gingivalis* W83.

Bases sublinhadas referem-se ao sítio de restrição de cada enzima (New England Biolabs Inc., Hitchin, Hertfordshire, Inglaterra).

3.4 Determinação das concentrações limitantes, adequadas e de excesso de ferro

A cepa padrão de *P. gingivalis* ATCC33277 e a linhagem mutante Pg33277Δ0741 foram cultivadas em TSAY. A fim de exaurir o estoque interno de ferro, *P. gingivalis* ATCC33277 foi cultivada em TSB suplementado com extrato de levedura e menadiona (1µg/ml), sem adição de hemina, por quatro repiques sucessivos.

As cepas de *P. gingivalis* ATCC33277, *P. gingivalis* ATCC33277 com ferro exaurido e Pg33277Δ0741 foram cultivadas em TSB suplementado de extrato de levedura e menadiona nas seguintes concentrações de hemina: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 50,0 e 100,0 µg/ml. A DO₆₀₀ inicial foi ajustada para 0,2 e acompanhada a cada 24 horas até atingir 96 horas.

3.5 Formação de monobiofilme de cepas padrão de *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes em diferentes concentrações de ferro, ao longo do tempo

A capacidade de formação de biofilmes das cepas de *P. gingivalis* ATCC33277 e *P. gingivalis* W83 foi investigada em placas de 48 poços, segundo Capestany et al. (2008), com modificações.

Este experimento permitiu avaliar a influência das diferentes concentrações de ferro na capacidade de amostras de *P. gingivalis* ATCC33277, Pg33277Δ0741 e Pg33277Δ0531 e *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637 e PgW83Δ1380 formarem biofilme além de avaliar a biomassa desse biofilme ao longo do tempo (24, 48, 72 e 96 horas). Assim, as cepas de *P. gingivalis* foram cultivadas como citado anteriormente em TSAY enriquecido e incubadas a 37 °C em anaerobiose. Após o crescimento, foram repicadas para TSBY e incubadas a 37 °C, em anaerobiose. Foi realizada subcultura com DO₆₀₀ inicial de 0,2. Após a incubação em anaerobiose por 16 horas, os tubos foram centrifugados a 4.500 x g por 4 minutos a temperatura ambiente. Os sedimentos foram suspensos nas concentrações pré-determinadas de hemina (TSBY sem hemina, 1 µg/ml, 5 µg/ml e 15 µg/ml). Alíquotas de 500 µl das suspensões foram distribuídas em quintuplicata em placas de poliestireno de 48 poços. As placas foram incubadas a 37 °C em anaerobiose durante os períodos determinados para permitir a formação do biofilme. Os experimentos foram repetidos três vezes.

A leitura da biomassa foi realizada utilizando-se o protocolo da coloração por safranina 0,4% (Durso et al., 2014). Para a evidenciação do biofilme, o sobrenadante foi aspirado e 100 µl de solução de safranina a 0,4% foi adicionado para coloração das bactérias em cada poço. As placas foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Os biofilmes corados pela safranina foram lavados três vezes por imersão em água destilada, as placas foram secas por inversão sobre papel toalha e então os biofilmes foram solubilizados em 200 µl de etanol 95%. Após 15 minutos, três alíquotas de 50 µl de cada poço foram

transferidas para placas de 96 poços e a leitura da absorbância (A_{490}) foi realizada em leitor de placas (Bio-Rad). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos nas quintuplicatas dos três ensaios independentes ($n = 15$). Uma vez verificada a distribuição das amostras, análise não paramétrica (Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn) foi empregada para comparar as biomassas produzidas pelas linhagens mutantes com as biomassas das cepas selvagens. Os resultados foram considerados significantes quando o valor de p foi $< 0,05$.

3.6 Coagregação de *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes com *S. gordonii* DL1 e com *P. intermedia* 17

Os ensaios de coagregação entre as cepas testadas foram realizados segundo Cisar et al. (1979) e Shen et al. (2005), com modificações.

Culturas das cepas de *P. gingivalis* W83, PgW83 Δ 0637 e PgW83 Δ 1380, *P. gingivalis* ATCC33277, Pg33277 Δ 0741 e Pg33277 Δ 0531 e *P. intermedia* 17 foram crescidas em TSAY e incubadas a 37 °C em anaerobiose. Após o crescimento, foram repicadas para TSBY e incubadas por 16 horas em anaerobiose a 37 °C. A cultura de *S. gordonii* DL1 foi crescida em TSA por 24 horas a 37 °C em anaerobiose, repicada para TSB e incubada a 37 °C O/N em câmara de anaerobiose. Os tubos contendo as culturas de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *S. gordonii* foram centrifugados a 4.500 $\times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o sedimentado lavado duas vezes com 10 ml de tampão de coagregação (Okuda et al., 2012) [1 mM de tampão fosfato (pH 8,0); 0,1 mM CaCl_2 ; 0,1 mM MgCl_2 ; 150 mM NaCl]. Cada suspensão celular foi ajustada para $\text{DO}_{600} = 1,0$ e foram distribuídos volumes de 3,0 ml para avaliar a autoagregação e volumes iguais (1,5 ml) de cada cepa para tubos de ensaio de vidro, objetivando avaliar a coagregação a 37 °C. Assim, foi verificada a DO_{600} no tempo zero (T_0) e a cada hora, durante um período total de 6 horas consecutivas. Os ensaios de coagregação constituíram de três ensaios independentes, realizados em triplicata.

Para as leituras de densidade óptica, uma alíquota de 600 μl foi removida, transferida para cubeta acrílica e a leitura realizada em espectrofotômetro. Tubos contendo apenas o volume total de tampão de coagregação serviram como controles negativos.

Os graus de autoagregação e de coagregação (de cada par) foram calculados segundo Shen et al. (2005). A porcentagem de autoagregação foi calculada pela equação abaixo onde DO_{T0} corresponde à medida de $DO_{600}= 1,0$ acertada imediatamente após terem sido as cepas bacterianas suspensas no tampão de coagregação e DO_{Tn} corresponde à densidade óptica no tempo determinado.

$$\% \text{ Autoagregação} = \frac{DO_{T0} - DO_{Tn}}{DO_{T0}} \times 100$$

A porcentagem de coagregação foi calculada pela equação apresentada abaixo, DO_A e DO_B constituíram os controles das suspensões das bactérias isoladas, sendo DO_{A+B} correspondente à leitura do tubo contendo a mistura dos microrganismos A e B, associados após cada período de contato.

$$\% \text{ Coagregação} = \frac{(DO_A + DO_B) - 2 \times DO_{A+B}}{DO_A + DO_B} \times 100$$

Como ocorre uma diminuição da DO_{600} durante este processo, significando que a coagregação está ocorrendo, as medidas de DO_{600} foram transformadas matematicamente e então calculadas como $(\log DO) \times (-1)$, para facilitar a leitura e análise dos resultados.

3.7 Formação de biofilme misto de *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes com *S. gordonii* DL1 e com *P. intermedia* 17, ao longo do tempo

O cultivo de *S. gordonii* DL1, *P. intermedia* 17 e das cepas de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637 e PgW83Δ1380 e *P. gingivalis* ATCC33277, Pg33277Δ0741 e Pg33277Δ0531 foi realizado como citado anteriormente. Após o repique para TSBY, foram realizadas subculturas das cepas de *P. gingivalis* com DO_{600} inicial de 0,5 com a finalidade de padronizar as condições fisiológicas dos inóculos que foram incubadas em anaerobiose até atingir a DO_{600} final de 1,0. A DO_{600} da cultura de *S. gordonii* e de *P. intermedia* também foram ajustadas para 1,0. Alíquotas de 250 µl de cada cepa foram introduzidas nos poços quando da formação do biofilme misto, e 500 µl quando o objetivo era avaliar a formação de monobiofilme. As placas foram incubadas em anaerobiose por 24 horas a 37 °C.

A leitura da biomassa e a análise dos dados foram realizadas conforme descrito anteriormente, no item 3.5.

3.8 Determinação da capacidade de adesão, invasão e persistência de *P. gingivalis* a células endoteliais da artéria coronária humana (HCAEC)

Os ensaios de adesão das cepas de *P. gingivalis* a células endoteliais seguiram o protocolo de Rodrigues et al. (2012). A partir de estoque congelado, as células endoteliais (Human Coronary Artery Endothelial Cells, HCAEC, Lonza Allendale, NJ, EUA), foram cultivadas em meio celular basal (EBM-2, Lonza) suplementado com EGM-2MV (Lonza) e incubadas em atmosfera de 5% CO₂ (Shel Lab, Cornelius, Oregon, EUA) a 37 °C. Após atingirem a monocamada com confluência superior a 90%, as células foram lavadas uma vez com 10 ml de PBS aquecido e tratadas com 7 ml de Accutase (Gibco, Carlsbad, CA, EUA). Após o descolamento das células da superfície da garrafa, elas foram recolhidas em tubo Falcon (BD) de 50 ml. A suspensão foi centrifugada a 50 x *g*, a temperatura ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi suspenso em 10 ml de meio. A concentração celular foi medida adicionando-se 10 µl do corante Trypan Blue Stain 0,4% (Life) a 10 µl da suspensão celular. A leitura ocorreu em contador celular Countess (Automatic Cell Counter, Invitrogen). Alíquotas de 1 x 10⁵ cel/ml foram distribuídas em poços da placa de 24 poços e os mesmos foram preenchidos com meio EGM-2MV até completarem o volume total de 1 ml. As placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ por 16 horas a 37 °C.

As cepas de *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531 e *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380 foram repicadas a partir de TSAY, após dois ou três dias de incubação foram transferidas para TSBY. Os inóculos para os experimentos foram preparados a partir da cultura no final da fase logarítmica de crescimento, estabelecendo que alíquotas de cada cepa de *P. gingivalis* contendo 1 x 10⁷ ufc/ml foram distribuídas em cada poço, juntamente com 1 x 10⁵ células endoteliais/ml, para que a multiplicidade de infecção entre as células e as bactérias fosse de 1:100. (1 x 10⁵ cel HCAEC/ml : 1 x 10⁷ ufc *P. gingivalis* /ml) (Lamont et al., 1995).

Após 16 horas de incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado, as células HCAEC foram lavadas uma vez com 1 ml de meio EGM-2 aquecido. Alíquotas de 5 µl foram distribuídas em cada poço, contendo 1 x 10⁷ ufc/ml de *P. gingivalis*, juntamente com 1 ml de meio EGM-2 sem antibiótico. Dois mililitros da suspensão padronizada foram transferidos para tubo de microcentrífuga (Jet Biofill) para a extração de DNA do inóculo inicial. A

avaliação da capacidade de adesão foi realizada após 30 minutos e 1 h e 30 minutos de contato entre as células e as bactérias, em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse período os poços foram lavados três vezes com 1 ml de PBS aquecido e a cada poço foram adicionados 330 µl de Nuclei Lysis Solution (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA). A extração do DNA ocorreu de acordo com instruções do fabricante.

Para avaliar a capacidade de invasão e persistência de *P. gingivalis*, após 1 h e 30 minutos de contato, os poços foram lavados uma vez com 1 ml de meio EGM-2 aquecido e a cada poço foi adicionado 1 ml de meio de cultura EGM-2 contendo gentamicina (300 µg/ml) e metronidazol (200 µg/ml) para a eliminação das bactérias não invadidas. As duas placas foram novamente incubadas em atmosfera de CO₂ e após 1 hora, uma das placas foi lavada três vezes com 1 ml de PBS e foi adicionado a cada poço 330 µl de Nuclei Lysis Solution para extração de DNA para avaliar a capacidade de invasão. A outra placa foi lavada apenas uma vez com 1 ml de meio EGM-2, a cada poço foi adicionado 1 ml de meio EGM-2 sem antibiótico e ela foi novamente incubada por mais 21 h e 30 minutos (totalizando 24 h após o contato inicial) para avaliarmos a capacidade de persistência de *P. gingivalis* em células endoteliais HCAEC. Os poços foram lavados três vezes com 1 ml de PBS aquecido e foi adicionado a cada poço 330 µl de Nuclei Lysis Solution para a extração de DNA.

Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

3.8.1 Extração de DNA

A extração do DNA seguiu o protocolo sugerido pelo fabricante, com modificações. O tubo contendo o inóculo inicial foi centrifugado a 13.000 x *g* por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi suspenso em 1000 µl de Nuclei Lysis Solution, do Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Após os ensaios de adesão, invasão e persistência, foram adicionados 330 µl de Nuclei Lysis Solution a cada poço. A solução contendo as culturas celulares e bacteriana de cada amostra foi transferida para o mesmo tubo de microcentrífuga de 2 ml e foram incubados por 5 minutos a 80 °C. À temperatura ambiente, foram adicionados a cada tubo 3 µl de RNase, os tubos foram invertidos cuidadosamente 5 vezes e novamente incubados a 37 °C por 30 minutos. Quando os tubos atingiram a temperatura ambiente foram adicionados 330 µl de Protein Precipitation Solution, os tubos foram vigorosamente agitados por 30

segundos e incubados em gelo por 5 minutos. Foi realizada uma nova centrifugação a $13.000 \times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, contendo 1,2 ml de isopropanol. Os tubos foram invertidos cuidadosamente 10 vezes para permitir a mistura das soluções e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir a precipitação do DNA de maneira mais eficaz.

Após a realização de todos os experimentos, procedeu-se com a finalização da extração de DNA. Os tubos foram centrifugados a $13.000 \times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e foi adicionado vagarosamente a cada tubo 600 μl de etanol 70% para a lavagem do DNA. Os tubos foram centrifugados a $13.000 \times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente. O etanol 70% foi cuidadosamente removido e os tubos foram invertidos para permitir a evaporação do etanol 70% por 5 a 7 minutos. Para cada amostra foram adicionados 30 μl de Elution Buffer, para solubilizar as amostras de DNA, obtendo DNA mais concentrado de cada amostra. Os tubos foram incubados a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas, com agitação de 600 rpm e armazenados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso. Foram obtidas quatro amostras de DNA para cada condição.

3.8.2 PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)

A realização do qPCR foi realizada usando 2 μl do DNA de cada amostra, numa mistura contendo 0,2 μl de cada iniciador (10 μM) (Tabela 4), 10 μl de Maxima SYBR Green (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e água até volume final de 20 μl . As reações foram realizadas em triplicata para cada amostra de DNA. Como controle negativo foi utilizada água no lugar do DNA, e como controle positivo do gene 16S rRNA foi utilizado DNA genômico de *P. gingivalis* (10 ng/ μl) e para o 18S rRNA, 10 ng/ μl de produto de PCR do gene 18S rRNA.

Foram utilizados iniciadores específicos para o gene 16S rRNA de *P. gingivalis* para permitir a quantificação de bactérias presentes em cada condição avaliada e iniciadores do gene 18S rRNA para permitir a normalização do número de células endoteliais HCAEC presentes em cada ensaio.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados para a realização do RT-qPCR.

Iniciador	Sequência 5' - 3'
18S rRNA	F CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT*
	R CGAACCTCCGACTTTCGTTCT
16S rRNA	F GTAGATGACTGATGGTGAAAACC**
	R ACGTCATCCCCACCTTCCTC

* Rodrigues et al., 2012

** Tran, Rudney, 1996.

A amplificação e detecção foram realizados em placas de 96 poços (Bio-Rad) em termociclador iCycler iQ (Bio-Rad), utilizando os seguintes parâmetros: 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao final das reações, foi realizada a curva de dissociação, aumentando-se gradativamente 0,4 °C a cada 10 segundos, de 60 °C até 100 °C, para confirmar a especificidade dos iniciadores.

Os dados foram analisados utilizando o programa Bio-Rad iQ5 Optical System e a partir deles foi construída uma planilha para a normalização dos dados (utilizando o número de transcritos do gene 18S rRNA) e a quantificação relativa entre a cepa padrão e sua respectiva linhagem mutante foi realizada através do programa DART-PCR, conforme descrito no item 3.2.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Porphyromonas gingivalis, um bacilo Gram negativo, está associado com a doença periodontal crônica (Abiko et al., 2010; Haffajee, Socransky, 1992, 1994) e possui diversos fatores de virulência associados com colonização da cavidade bucal e destruição dos tecidos do hospedeiro (Hamada et al., 2002; Holt et al., 1999; Katz et al., 2002; Lamont, Jenkinson, 1998; Takeuchi et al., 2001), no entanto, para desempenhar essas características, *P. gingivalis* necessita de ferro (Olczak et al., 2012; Simpson et al., 2000) e desenvolveu sistemas para captá-lo do ambiente (Olczak et al., 2005; Schifferle et al., 1996). A colonização microbiana e a formação do biofilme dental constituem etapas fundamentais para o estabelecimento de *P. gingivalis* na cavidade bucal (Darveau et al., 1997; Rickard et al., 2003; Shen et al., 2005) e sua capacidade coagregativa é um dos fatores que contribui, nas etapas iniciais, para o sucesso da associação (Cook et al., 1998; Grenier, Mayrand, 1987; Kamaguchi et al., 2003; Kolenbrander et al., 2006; Lamont et al., 1994). *P. gingivalis* se associa com *P. intermedia* (Byrne et al., 2013; Kamaguchi et al., 2003; Socransky et al., 1998) e com *S. gordonii* (Cook et al., 1998; Kuboniwa et al., 2010; Lamont et al., 2002; Rosan, Lamont, 2000), sendo que essa associação promove uma expressão diferencial de genes, que podem ser importantes para o estabelecimento de *P. gingivalis* na cavidade bucal (Simionato et al., 2006). *P. gingivalis* é considerado um patógeno chave da periodontite e havendo o estabelecimento de uma comunidade desbiótica pode promover um sinergismo entre as espécies, culminando com aumento da sua patogenicidade e desenvolvimento da periodontite (Hajishengallis, Lamont 2012; Jiao et al., 2014).

Baseado nessas informações, esse trabalho objetivou esclarecer o papel de genes selecionados durante a formação de biofilmes heterotípicos de *P. gingivalis* com *S. gordonii* e verificar se esses genes são importantes: para a formação de biofilmes em diferentes concentrações de ferro; para a formação de biofilmes heterotípicos com *S. gordonii* e *P. intermedia*; para a coagregação com *S. gordonii* e *P. intermedia*; e durante a adesão, invasão e persistência a células endoteliais.

4.1 Determinação do perfil de expressão gênica de *P. gingivalis* em biofilme com *S. gordonii*

A Tabela 5 apresenta os resultados da expressão relativa de dez genes relacionados com a formação de biofilme em *P. gingivalis*. Os genes de *P. gingivalis* diferencialmente expressos que apresentaram valor de $p < 0.05$ e ao menos 1,5 vezes mais expresso foram considerados biológica e estatisticamente significantes, como recomendado por diferentes estudos (Dalman et al., 2012; Peart et al., 2005; Van Peer et al., 2012), os que apresentaram valor de $p > 0.05$ e expressão relativa menor que 1,5 vezes foram considerados com expressão não diferente (ND).

Nos biofilmes homotípicos de *P. gingivalis* os genes PGN0293 (*ragA*), PGN0531 e PGN1208 (*clpB*) foram mais expressos em biofilmes de 10 minutos do que em biofilmes de 40 minutos, com nível de transcritos bastante distintos entre as duas condições.

Tabela 5 - Genes de *P. gingivalis* expressos diferencialmente durante a formação de biofilme com *S. gordonii* oposto ao monobiofilme durante os estágios iniciais da formação de biofilme.

Número Do Locus	Gene	Homotípico 10 min x Homotípico 40 min	Heterotípico 10 min x Heterotípico 40 min	Heterotípico 10 min x Homotípico 10 min	Heterotípico 40 min x Homotípico 40 min
PGN0043	<i>ftsH</i>	ND	1,9	ND	ND
PGN0293	<i>ragA</i>	5,6	1,7	ND	2,7
PGN0489		ND	2,3	1,9	-1,6
PGN0558	<i>hmuY</i>	ND	-5,2	ND	ND
PGN0531		7,3	ND	ND	4,5
PGN0567	<i>prtC</i>	1,6	2,0	ND	ND
PGN0741		ND	1,7	1,7	ND
PGN1111	<i>fhs</i>	ND	2,7	ND	ND
PGN1208	<i>clpB</i>	7,2	ND	1,6	8,4
PGN2024		ND	ND	-1,6	ND

ND expressão não diferente.

Nos biofilmes heterotípicos a maioria dos genes estudados apresentaram-se diferencialmente expressos nos dois tempos estudados. A maior razão de expressão foi

detectada para o gene PGN0558 (*hmuY*), relacionado na literatura com a aquisição de ferro, este foi expresso 5,2 vezes mais aos 40 minutos do que aos 10 minutos.

Aos 10 minutos de coadesão, os genes que se mostraram mais expressos no heterobiofilme apresentaram razão de expressão variando entre 1,6 e 1,9. Diferenças mais marcantes foram verificadas aos 40 minutos, com os genes PGN0531 e PGN1208 (*clpB*).

Baseados nesses resultados foram selecionados os genes PGN0741 e PGN0531, pois acreditamos que esses são fortes candidatos a apresentarem importância tanto na progressão do biofilme de *P. gingivalis* no período testado, como após a coadesão de *S. gordonii*.

O possível receptor dependente de TonB (PGN0741) é uma proteína de membrana externa que auxilia no transporte de moléculas de ferro através da membrana externa, e foi expresso positivamente em biofilmes heterotípicos com *S. gordonii*. Embora sua função não tenha ainda sido determinada, esse gene já se mostrou regulado positivamente em *P. gingivalis* pelo contato com *S. gordonii* (Simionato et al., 2006). Apesar da razão de expressão quando diferencialmente expresso ter sido 1,7, as funções deste gene merecem ser investigadas e seu potencial de modulação de biofilmes de *P. gingivalis* esclarecido. Nos tecidos periodontais e no fluido gengival a disponibilidade de ferro é variável, dependendo da condição periodontal e, portanto a concentração de ferro pode variar entre indivíduos e mesmo entre diferentes sítios no mesmo paciente (Wang et al., 1990). Assim sendo, a deleção desse gene e o estudo da formação de biofilmes em diferentes concentrações de ferro podem contribuir para o entendimento do papel deste gene em biofilmes de *P. gingivalis in vitro* para podermos compreender melhor o que ocorre *in vivo* no sulco gengival e bolsa periodontal.

O domínio do fator de von Willebrand (*fvW*) é bem conservado (Ponting et al., 1999), e parece estar relacionado com eventos de ligação/adesão na presença de íons metálicos em mamíferos (Baldwin et al., 1998), mas a função em procariotos ainda não está esclarecida. Em *P. gingivalis* ATCC33277, os bancos de dados relatam que essa proteína é possivelmente uma lipoproteína transmembrana e em *P. gingivalis* W83, sua localização é citoplasmática (Los Alamos Oralgen), revelando diversidade em relação às cepas testadas no estudo. Em biofilmes heterotípicos entre *P. gingivalis* ATCC33277 e *S. gordonii*, a proteína hipotética de *P. gingivalis* (PGN0531 - von Willebrand tipo A - *fvW*) foi expressa positivamente, sugerindo sua importância na formação do biofilme, diferentemente do que foi observada em *S.*

agalactiae. O domínio do fator de von Willebrand tipo A presente no pilus de *S. agalactiae*, foi importante para a adesão às células epiteliais, mas não se mostrou essencial para a formação de biofilme sobre superfícies abióticas (Konto-Ghiorgi et al., 2009). No entanto, a metodologia utilizada para a formação do biofilme foi diferente da utilizada neste trabalho, e isto pode influenciar significativamente a quantificação de biofilmes, como observado em experimentos prévios neste laboratório. Assim, é de grande interesse verificar se a proteína hipotética (fator de von Willebrand tipo A) em *P. gingivalis* possui função semelhante à exercida em *S. agalactiae*. Para isso, esse estudo avaliou tanto a formação de biofilmes mono e heterotípicos, como a adesão às células endoteliais de linhagem mutante com deleção para este gene.

4.2 Construção das linhagens mutantes de *P. gingivalis*

Após a amplificação por PCR dos fragmentos nas regiões C3' e C5' terminais de cada gene alvo, os produtos foram inseridos no vetor de clonagem pPR-UF1 e transformados em *E. coli* DH5 α . O plasmídeo foi extraído e linearizado e então foi realizada a eletroforese em gel de agarose para confirmarmos a inserção dos dois fragmentos no vetor de clonagem pPR-UF1 (Figura 1).

Figura 1: Foto da eletroforese em gel de agarose confirmando a inserção dos fragmentos A e B para o gene PGN0741/PG0637 no vetor de clonagem pPR-UF1, digerido com as enzimas de restrição Pvu I e Eco RV, gerando fragmentos de 2,5 kb, 2,4 kb, 0,5 e 0,4kb .

Após a confirmação da inserção dos fragmentos A e B, o plasmídeo foi inserido em *P. gingivalis* ATCC33277 e W83 eletrocompetentes e o produto foi plaqueado em AS contendo eritromicina. As colônias que cresceram no meio contendo antibiótico, tiveram seu DNA extraído, foi realizado um PCR para selecionarmos colônias nas quais a mutação de fita dupla ocorreu (Figura 2), mas esta só foi confirmada através do sequenciamento.

Figura 2: Foto da eletroforese em gel de agarose confirmando a mutação nas cepas de *P. gingivalis* ATCC33277 e W83 (vermelho) para o gene PGN0741/PG0637 e as bandas controle e mutação fita simples (amarelo).

4.3 Determinação das concentrações limitantes, adequadas e de excesso de ferro

A Figura 3 apresenta os resultados da medida da DO_{600} de culturas de *P. gingivalis* desenvolvidas em diferentes concentrações de hemina. Podemos verificar que na cepa selvagem as concentrações entre 10 e 15 $\mu\text{g/ml}$ proporcionaram melhor desenvolvimento da cultura em 24 horas de crescimento. Após 72 e 96 horas o valor da DO_{600} foi reduzido uniformemente independente da concentração de hemina utilizada.

No entanto, quando foi promovida a exaustão de ferro no meio de cultura, embora as concentrações de 10 e 15 $\mu\text{g/ml}$ tenham sido as que promoveram maior crescimento da

cultura, a concentração de hemina influenciou de forma mais determinante o crescimento de *P. gingivalis*, principalmente nas concentrações abaixo de 5 µg/ml, que se mostraram limitantes para o crescimento. A concentração de hemina sugerida para ser incorporada em meios de cultura (5 µg/ml) foi a que permitiu o crescimento uniforme de *P. gingivalis* nos quatro períodos testados.

Figura 3 - Crescimento de *P. gingivalis* em diferentes condições e concentrações de hemina ao longo do tempo. (A) *P. gingivalis* ATCC33277, (B) *P. gingivalis* ATCC33277 com ferro exaurido e (C) Pg33277Δ0741.

Comparando com a cepa selvagem, a deleção do gene PGN0741 (possível receptor dependente de TonB) prejudicou o crescimento da cultura, que apresentou comportamento mais variável, sendo que concentrações maiores como 30, 50 e 100 µg/ml permitiram o melhor crescimento, mostrando a importância do gene no crescimento bacteriano possivelmente pela sua função na aquisição/transporte de ferro por *P. gingivalis*. No entanto, este estudo mostra que provavelmente outros genes de *P. gingivalis* devem suprir as funções de PGN0741, uma vez que, apesar de exigir maiores concentrações de ferro, essas concentrações permitiram o desenvolvimento das culturas de forma semelhante ao da cepa selvagem.

Limitações nessa metodologia não permitiram determinar as concentrações tóxicas de hemina que devem estar acima de 100 µg/ml.

Com base nesses resultados, foram selecionadas as concentrações de 1, 5 e 15 µg/ml, para serem usadas em ensaios futuros, onde pretendemos verificar as diferenças mais marcantes de comportamento, além da ausência de hemina no meio.

4.4 Formação de monobiofilme de cepas padrão de *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes em diferentes concentrações de ferro, ao longo do tempo

A Figura 4 apresenta os resultados da quantificação da biomassa (A_{490}) dos monobiofilmes das cepas selvagens e suas respectivas linhagens mutantes, nas diferentes concentrações de hemina, após 24, 48, 72 e 96 horas de formação. O receptor dependente de TonB em *P. gingivalis* ATCC33277 (PGN0741) foi importante para a formação do biofilme, uma vez que a deleção do gene levou à formação de biofilmes com menor biomassa em relação à cepa selvagem. Esse achado confirmou os resultados de Simionato et al. (2006) que verificaram regulação positiva desse gene nas fases iniciais do biofilme e os resultados previamente apresentados nesse trabalho, nos quais a regulação foi positiva no biofilme heterotípico aos 10 minutos, em relação ao biofilme homotípico e em relação ao biofilme heterotípico aos 40 minutos. Os resultados deste estudo demonstraram também que a regulação positiva do gene PGN0741 em *P. gingivalis* ATCC33277 nas fases iniciais do biofilme pode ser responsável por alterações na biomassa de 24 horas que persistiram até

96 horas, permitindo futuros questionamentos sobre os eventos moleculares que ocorrem nessa condição.

Figura 4 - Quantificação da biomassa (A_{490nm}) dos monobiofilmes de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741 oriundas de cultivo normal e de cultivo com uma passagem sem hemina (exaurido) e suspensão em diferentes concentrações de hemina, após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. A) Normal Sem Hemina; B) Exaurido Sem Hemina; C) Normal 1 μ g/ml hemina; D) Exaurido 1 μ g/ml hemina; E) Normal 5 μ g/ml hemina; F) Exaurido 5 μ g/ml hemina; G) Normal 15 μ g/ml hemina; H) Exaurido 15 μ g/ml hemina.

O possível receptor dependente de TonB foi importante para a formação do biofilme de *P. gingivalis* ATCC33277, independente da exaustão prévia de hemina, concentração de hemina e tempo de formação de biofilme analisados, uma vez que foram observadas diferenças estatisticamente significante entre os biofilmes de *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741 em todas as concentrações avaliadas, bem como nos intervalos de tempo testados (Apêndice A). Os resultados apresentados por *P. gingivalis* estão de acordo com estudos em outras bactérias, como com *Pseudomonas aeruginosa* e *Xylella fastidiosa*. Em *P. aeruginosa* a presença de ferro é essencial para a formação de biofilmes, no entanto a deleção de um de seus três genes homólogos de TonB (TonB1) não promoveu alterações na sua capacidade de transporte de ferro em ambientes com concentrações ideais desse íon (Zhao et al., 1998; Zhao, Poole, 2002), mas resultou em uma diminuição da capacidade de formação de biofilme, além de influenciar a motilidade e o *quorum sensing* da bactéria (Abbas et al., 2007). Em *X. fastidiosa*, a deleção de um dos quatro genes homólogos de TonB também resultou em diminuição da capacidade de formação de biofilme e motilidade, além de promover a diminuição da virulência da bactéria (Cursino et al., 2009).

Em *P. gingivalis* ATCC33277 a concentração de hemina foi importante para a formação do biofilme e essa influência apresentou um comportamento variável ao longo do tempo. Já em Pg33277Δ0741 a influência da concentração foi mais evidente nas primeiras 24 horas de formação do biofilme ou em 96 horas.

Diferentemente de *P. gingivalis* ATCC33277, a importância do possível receptor dependente de TonB não ficou tão evidente em *P. gingivalis* W83, pois a diferença entre o biofilme da cepa padrão e PgW83Δ0637 não foi uniforme (Figura 4 e Apêndice C), sugerindo que *P. gingivalis* W83 possa compensar a ausência do gene PG0637 pela ativação de outros genes com função semelhante. Analogamente aos resultados obtidos com os ensaios de coagregação, encontramos diferenças entre as cepas selvagens de *P. gingivalis* ATCC33277 e *P. gingivalis* W83 no que se refere aos ensaios de quantificação de biomassa de biofilme. Vários autores relatam que *P. gingivalis* ATCC33277 e *P. gingivalis* W83 se comportam de maneiras distintas, devido às diferenças fenotípicas entre elas, como o tipo de fímbria, presença de cápsula, capacidade invasiva e de formação de biofilme (Amano et al., 2000, 2004; Chen et al., 2004; Duncan et al., 1993; Kuboniwa et al., 2010; Lamont, Jenkinson, 1998). A formação de biofilme em diferentes concentrações de hemina pode ser mais um

diferencial para comparar essas duas cepas e reforça a necessidade de se utilizar diferentes cepas padrões para o estudo do comportamento de *P. gingivalis*.

A importância na formação do biofilme do *fvW* (PGN0531), não ficou tão evidente (Figura 5 e Apêndice B), pois não foram encontradas diferenças significantes entre *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531 em todas as condições avaliadas. Apesar do gene ter sido expresso positivamente em biofilmes heterotípicos com *S. gordonii*, é possível que ele possua papel na formação de monobiofilmes de *P. gingivalis*, pois foram encontradas diferenças de biomassa entre *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531. Pg33277Δ0531 apresentou comportamento semelhante a *P. gingivalis* ATCC33277 em relação à concentração de hemina, sugerindo que este gene não está envolvido com eventos relacionados com aquisição de ferro por *P. gingivalis* ATCC33277.

Diferenças na biomassa de biofilme entre *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380 (Figura 5 e Apêndice D) foram mais evidentes após 48 horas de formação de biofilme, sugerindo que em *P. gingivalis* W83 *fvW* tenha uma função mais tardia, independente da concentração e exaustão prévia de hemina. A influência da concentração de hemina sobre a biomassa do biofilme foi mais observada em Pg33277Δ0531 em comparação com PgW83Δ1380, demonstrando variação de comportamento também entre as linhagens mutantes de *P. gingivalis* ATCC33277 e *P. gingivalis* W83 para o mesmo gene.

Na cepa selvagem *P. gingivalis* ATCC33277 e em ambos os mutantes a exaustão prévia de hemina não apresentou diferença de biomassa em relação à cultura cultivada em meio contendo hemina, em praticamente todos os intervalos e concentrações avaliados, isso pode ter ocorrido pelo fato do estoque interno de ferro não ter sido totalmente esgotado pelo método utilizado. A exaustão prévia de hemina teve uma maior influência sobre os biofilmes em cepas de *P. gingivalis* W83, tanto selvagem quanto mutantes em comparação à *P. gingivalis* ATCC33277, mas essa diferença não ocorreu em todas as condições avaliadas, sugerindo que a utilização de hemina em ambientes com carência de ferro e o armazenamento interno de ferro em *P. gingivalis* W83 seja diferente daquele de *P. gingivalis* ATCC33277.

Figura 5 - Quantificação da biomassa (A_{490nm}) dos monobiofilmes de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ1380, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531, oriundas de cultivo normal e de cultivo com uma passagem sem hemina (exaurido) e suspensão em diferentes concentrações de hemina, após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. A) Normal Sem Hemina; B) Exaurido Sem Hemina; C) Normal 1 $\mu\text{g/ml}$ hemina; D) Exaurido 1 $\mu\text{g/ml}$ hemina; E) Normal 5 $\mu\text{g/ml}$ hemina; F) Exaurido 5 $\mu\text{g/ml}$ hemina; G) Normal 15 $\mu\text{g/ml}$ hemina; H) Exaurido 15 $\mu\text{g/ml}$ hemina.

Os resultados demonstram que a associação de *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC33277 e suas linhagens mutantes para o receptor dependente de TonB com *S. gordonii* e *P. intermedia* foram positivas para ambas as espécies associadas, já que as taxas de coagregação foram superiores às taxas apresentadas pela autoagregação de cada uma das espécies, exceto na associação entre *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* ATCC33277, onde *P. intermedia* apresentou taxa de autoagregação semelhante à taxa de coagregação.

Figure 1: Bacterial growth curves for *S. gordonii* and *P. gingivalis* strains. The graph plots $(\log DO) \times (-1)$ on the y-axis (ranging from 0 to 2.5) against time in hours (Tempo (h)) on the x-axis (ranging from 0 to 6). The legend identifies eight data series:

- S. gordonii* DL1 (blue line with diamond markers)
- PgW83Δ0637 (green line with triangle markers)
- Pg33277Δ0741 (cyan line with asterisk markers)
- S. gordonii* DL1 + PgW83Δ0637 (light blue line with plus markers)
- S. gordonii* DL1 + Pg33277Δ0741 (light green line with cross markers)
- P. gingivalis* W83 (dark red line with square markers)
- P. gingivalis* ATCC33277 (grey line with x markers)
- S. gordonii* DL1 + *P. gingivalis* W83 (orange line with circle markers)
- S. gordonii* DL1 + *P. gingivalis* ATCC33277 (pink line with dash markers)

The graph demonstrates that the co-cultures of *S. gordonii* DL1 with *P. gingivalis* W83 and *P. gingivalis* ATCC33277 exhibit significantly higher growth rates compared to the individual strains, reaching values above 2.0 $(\log DO) \times (-1)$ by 6 hours.

Figura 7 - Capacidade de autoagregação e coagregação das cepas de *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ0637, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741, ao longo do tempo (T0 – T6), com *P. intermedia* 17.

Tabela 6 - Porcentagem de autoagregação e de coagregação, das cepas de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741. Autoagregação (A), com *S. gordonii* DL1 (B) e *P. intermedia* 17 (C), após 6 horas de contato.

A) Cepas		T6h
<i>S. gordonii</i> DL1		20.50%
<i>P. intermedia</i> 17		28.70%
<i>P. gingivalis</i> W83		23.10%
Pg W83Δ0637		18.50%
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		15.54%
Pg 33277Δ0741		19.35%

B) Cepas associadas		T6h
<i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> W83		85.30%
<i>S. gordonii</i> DL1 + Pg W83Δ0637		85.40%
<i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		29.40%
<i>S. gordonii</i> DL1 + Pg 33277Δ0741		29.40%

C) Cepas associadas		T6h
<i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> W83		82.20%
<i>P. intermedia</i> 17 + Pg W83Δ0637		83%
<i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		26.40%
<i>P. intermedia</i> 17 + Pg 33277Δ0741		36.20%

As linhagens mutantes para o gene TonB apresentaram comportamentos diferentes nas duas cepas padrões estudadas. Em *P. gingivalis* W83 houve uma pequena redução na capacidade autoagregativa da linhagem mutante PgW83Δ0637 em relação à cepa selvagem

(18,5% versus 23,1%), sugerindo que em *P. gingivalis* W83 este gene tenha envolvimento na adesão a outras células de *P. gingivalis* e não a células de outras espécies, já que a porcentagem de coagregação com *S. gordonii* ou *P. intermedia* foi semelhante à porcentagem apresentada pela cepa selvagem. Já em *P. gingivalis* ATCC33277, houve aumento da capacidade autoagregativa da linhagem mutante (15,5% versus 19,35%).

Em relação à capacidade de coagregação com *S. gordonii*, não houve diferença de comportamento entre *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ0637 nem entre *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741. No entanto, a coagregação com *P. intermedia* apresentou resultados diferentes. Em *P. gingivalis* W83 não houve diferença entre a cepa selvagem e a linhagem mutante, mas Pg33277Δ0741 apresentou taxa superior de coagregação em relação à cepa selvagem, sugerindo que em *P. gingivalis* ATCC33277 esse gene possa ter envolvimento na coagregação com *P. intermedia*. A deleção do gene pode ter alterado a superfície bacteriana expondo outras adesinas, mas há necessidade de outros estudos para confirmar essa hipótese.

Comparando as cepas selvagens *P. gingivalis* W83 e *P. gingivalis* ATCC33277, observamos que *P. gingivalis* W83 possui maior capacidade de autoagregação (23,1% versus 15,5%), bem como maior capacidade de coagregar com *S. gordonii* (85,3% versus 29,4%) e com *P. intermedia* (82,2% versus 26,4%), em conformidade com os dados de Barbosa et al. (2013).

Em relação às linhagens mutantes, observamos semelhança nas taxas de autoagregação entre PgW83Δ0637 (18,5%) e Pg33277Δ0741 (19,35%), no entanto, observamos que a capacidade de coagregação de PgW83Δ0637 com *S. gordonii* (85,4%) e *P. intermedia* (83%) foi bem superior à taxa apresentada por Pg33277Δ0741 (36,2% e 29,4%, respectivamente). Assim, as duas cepas que sofreram mutação no mesmo gene apresentaram capacidade coagregativa com *S. gordonii* e com *P. intermedia* de forma cepa específica e em diferentes graus. Podemos acrescentar que a taxa de coagregação de Pg33277Δ0741 com *P. intermedia* foi superior à taxa apresentada pela cepa selvagem *P. gingivalis* ATCC33277 (36,2% versus 26,4%), diferentemente do que ocorreu entre PgW83Δ0637 e sua cepa selvagem *P. gingivalis* W83 no qual as taxas foram semelhantes (83% versus 82,2%).

Os dados da coagregação de *P. gingivalis* W83 e *P. gingivalis* ATCC33277 revelaram que a associação com *S. gordonii* foi benéfica para ambas cepas de *P. gingivalis*. Dentro de

uma mesma espécie, as cepas podem se comportar de maneiras diferentes, nesse caso, apesar do comportamento ser semelhante, a taxa de coagregação apresentada por *P. gingivalis* W83 foi bem superior à taxa apresentada por *P. gingivalis* ATCC33277. Há inúmeros relatos na literatura ressaltando as diferenças existentes entre as cepas padrão de *P. gingivalis* mais comumente utilizadas (W83 e ATCC33277), como o tipo de fímbria, a presença ou ausência da fímbria menor e cápsula, tipos de gingipaínas, entre outras características (Aduse-Opoku et al., 2006; Amano et al., 1999; Bacic et al., 2005; Nadkarni et al., 2009; Naito et al., 2011; Nakagawa et al., 2000 e 2002; Yoshino et al., 2007) que podem resultar em características fenotípicas distintas.

As Figuras 8 e 9 e a Tabela 7 (A, B e C) referem-se à autoagregação e coagregação apresentados por *P. gingivalis* W83, PgW83Δ1380, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531 com *S. gordonii* DL1 e *P. intermedia* 17. As linhagens mutantes para o gene *fvW* apresentaram taxas de autoagregação semelhantes em PgW83Δ1380 (22%) e em Pg33277Δ0531 (24,4%). No entanto, PgW83Δ1380 apresentou taxa de coagregação com *S. gordonii* e *P. intermedia* superior às taxas de Pg33277Δ0531 (85% versus 27,2% e 74% versus 51,8%, respectivamente). Além disso, esses mutantes apresentaram comportamentos distintos em relação à associação com *P. intermedia*: enquanto PgW83Δ1380 apresentou taxa de coagregação inferior à cepa selvagem *P. gingivalis* W83 (74% versus 82,2%), Pg33277Δ0531 apresentou uma taxa de coagregação quase duas vezes maior que a apresentada pela cepa selvagem *P. gingivalis* ATCC33277 (51,8% versus 26,4%).

Figura 8 - Capacidade de autoagregação e coagregação das cepas de *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380 *P. gingivalis* ATCC33277, Pg33277Δ0531, ao longo do tempo (T0 – T6), com *S. gordonii* DL1.

Figura 9 - Capacidade de autoagregação e coagregação das cepas de *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380 *P. gingivalis* ATCC33277, Pg33277Δ0531, ao longo do tempo (T0 – T6), com *P. intermedia* 17.

Tabela 7 - Porcentagem de autoagregação e de coagregação, das cepas de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ1380, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531. Autoagregação (A), com *S. gordonii* DL1 (B) e *P. intermedia* 17 (C), após 6 horas de contato.

A) Cepas		T6h
<i>S. gordonii</i> DL1		20.50%
<i>P. intermedia</i> 17		28.70%
<i>P. gingivalis</i> W83		23.10%
Pg W83Δ1380		22%
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277		15.54%
Pg 33277Δ0531		24.42%

B) Cepas associadas	T6h	C) Cepas associadas	T6h
<i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> W83	85.30%	<i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> W83	82.20%
<i>S. gordonii</i> DL1 + Pg W83Δ1380	85%	<i>P. intermedia</i> 17 + Pg W83Δ1380	74%
<i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	29.40%	<i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	26.40%
<i>S. gordonii</i> DL1 + Pg 33277Δ0531	27.20%	<i>P. intermedia</i> 17 + Pg 33277Δ0531	51.80%

A deleção do gene *fvW*, em *P. gingivalis* W83 resultou na redução da capacidade coagregativa com *P. intermedia*, sugerindo que esta proteína tenha relação com a adesão espécie específica, já que ocorreu apenas com *P. intermedia* e não com *S. gordonii*.

Diferentemente do que ocorre com *P. gingivalis* W83, a associação de *P. intermedia* com *P. gingivalis* ATCC33277 não interferiu na capacidade coagregativa de *P. intermedia*, já que as taxas de coagregação foram semelhantes às apresentadas na autoagregação.

A diferença mais expressiva foi entre PgW83Δ1380 e Pg33277Δ0531, onde PgW83Δ1380 apresentou taxa inferior à *P. gingivalis* W83 e Pg33277Δ0531 apresentou taxa superior à *P. gingivalis* ATCC33277, sendo essa última quase o dobro da cepa selvagem. Esses resultados demonstram mais uma vez as diferenças entre as cepas de *P. gingivalis* e que esta diferença pode envolver também as linhagens mutantes.

4.6 Formação de biofilme misto de *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC33277 e suas respectivas linhagens mutantes com *S. gordonii* DL1 e *P. intermedia* 17, ao longo do tempo

A Figura 10 e a Tabela 8 apresentam os resultados das biomassas dos biofilmes formados entre *S. gordonii* DL1 com as cepas selvagens de *P. gingivalis* e suas linhagens mutantes para o receptor dependente de TonB.

Comparando os monobiofilmes formados entre *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ0637, observamos que houve aumento da biomassa após 48 horas de formação de biofilme e essa

diferença manteve-se ao longo dos intervalos avaliados. Já a deleção do gene em Pg33277Δ0741 promoveu redução na biomassa do biofilme em todos os intervalos avaliados, em comparação à cepa selvagem *P. gingivalis* ATCC33277, evidenciando a importância do gene que codifica para TonB na formação ou controle do biofilme de *P. gingivalis*, dependendo da cepa estudada. Assim como em *P. aeruginosa* (Abbas et al., 2007) e em *X. fastidiosa* (Cursino et al., 2009), em *P. gingivalis* ATCC33277, a deleção de TonB resultou em diminuição da capacidade de formação de biofilme, revelando que além da função na aquisição/transporte de ferro, TonB também tenha envolvimento na formação de biofilme.

Quando comparamos os biofilmes mistos com os monobiofilmes, observamos que a presença de *S. gordonii* DL1 promoveu alterações negativas, já que houve diminuição da biomassa do biofilme misto em relação aos monobiofilmes tanto na cepa selvagem (*P. gingivalis* W83) quanto na linhagem mutante (PgW83Δ0637). No entanto, para *S. gordonii*, a associação com *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ0637, promoveu aumento da biomassa do biofilme, pois os valores dos biofilmes mistos foram superiores aos apresentados pelo seu monobiofilme. A presença do *S. gordonii* não promoveu diferenças entre os biofilmes mistos de *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ0637. O aumento da biomassa do biofilme de PgW83Δ0637 em relação à *P. gingivalis* W83 sugere um envolvimento indireto do gene na capacidade de formar biofilme, esse envolvimento, entretanto, parece ser minimizado pela presença de *S. gordonii*, já que não houve diferenças entre os biofilmes mistos de *S. gordonii* com *P. gingivalis* W83 e de *S. gordonii* com PgW83Δ0637. Os valores de biomassa obtidos nos monobiofilmes para as cepas de *P. gingivalis* W83 foram superiores às biomassas dos biofilmes mistos com *S. gordonii*.

Analisando ainda a Figura 10 e a Tabela 8, observamos também que a presença de *S. gordonii* no biofilme misto influenciou a biomassa dos biofilmes, ora positivamente, ora negativamente. Para *P. gingivalis* ATCC33277 associação com *S. gordonii* foi negativa, pois a biomassa do biofilme diminuiu em relação ao monobiofilme, já para *S. gordonii* essa associação parece não provocar diferença na biomassa. Para Pg33277Δ0741, a presença de *S. gordonii* foi negativa nas primeiras 48 horas e após esse período, foi positiva, já para *S. gordonii*, ocorreu o oposto. Na literatura há inúmeros relatos da associação entre *S. gordonii* e *P. gingivalis* ATCC33277 (Cook et al., 1998; Chung et al., 2000; Lamont et al., 2002; Maeda et al., 2004; Park et al., 2005), no entanto, os ensaios do presente estudo demonstraram que

essa associação foi favorável apenas para *S. gordonii* e não para *P. gingivalis*. A associação com *S. gordonii*, em *P. gingivalis* ATCC33277, apresentou redução da biomassa em relação à biomassa do monobiofilme, em todos os intervalos de tempo avaliados, esses dados contradizem os relatos da literatura, que demonstram que as espécies se beneficiam com essa associação. No entanto diferentes metodologias foram empregadas para avaliação do biofilme formado entre *S. gordonii* e *P. gingivalis* e isso pode ter resultado nas diferenças nos resultados. Cook et al. (1998), analisaram o biofilme entre as espécies em PBS após 2 horas de contato, Chung et al. (2000) e Lamont et al. (2002) analisaram a formação de biofilme também em PBS após 4 horas de contato, diferentemente deste estudo que analisou o biofilme a partir de 24 horas e em TSBY. Kuboniwa et al. (2006), também estudou o biofilme entre estas espécies durante 24 horas, porém diferentes metodologias foram empregadas, Kuboniwa et al (2006) criaram um biofilme prévio de *S. gordonii* em PBS, enquanto neste estudo as bactérias foram incubadas simultaneamente e em TSBY.

Em Pg33277Δ0741, nas primeiras 48 horas a biomassa do biofilme misto foi inferior à biomassa do monobiofilme, mas após 72 horas a biomassa da associação com *S. gordonii* foi superior à do monobiofilme, sugerindo que a proteína possa ter influência sobre biofilmes mais maduros, quando associada a *S. gordonii*.

Figura 10 - Quantificação (A_{490nm}) da biomassa do biofilme de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637, *P. gingivalis* ATCC33277, Pg33277Δ0741 com *S. gordonii* DL1, ao longo do tempo. Barras representam o desvio padrão das amostras.

Tabela 8 - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações dos monobiofilmes de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741 com *S. gordonii* DL1, ao longo do tempo. Significância: valor $p < 0,05$.

Biofilmes	valores de p			
	24h	48h	72h	96h
<i>P. gingivalis</i> W83 x PgW83Δ0637	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x Pg33277Δ0741	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. gingivalis</i> W83 x <i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> W83	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
PgW83Δ0637 x <i>S. gordonii</i> DL1 + PgW83Δ0637	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x <i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Pg33277Δ0741 x <i>S. gordonii</i> DL1 + Pg33277Δ0741	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> W83 x <i>S. gordonii</i> DL1 + PgW83Δ0637	ns	ns	ns	ns
<i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x <i>S. gordonii</i> DL1 + Pg33277Δ0741	< 0.05	ns	ns	ns
<i>S. gordonii</i> DL1 x <i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> W83	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>S. gordonii</i> DL1 x <i>S. gordonii</i> DL1 + PgW83Δ0637	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>S. gordonii</i> DL1 x <i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	ns	ns	ns	< 0.05
<i>S. gordonii</i> DL1 x <i>S. gordonii</i> DL1 + Pg33277Δ0741	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

Os resultados da associação de *P. intermedia* 17 com as cepas de *P. gingivalis* W83 na formação de biofilme, estão apresentadas na Figura 11 e Tabela 9. Observamos que a presença de *P. intermedia* 17 influenciou negativamente o biofilme de *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ0637, sendo que em PgW83Δ0637, essa influência foi observada em todos os intervalos avaliados. Além disso, a influência também foi negativa para *P. intermedia* 17, pois a biomassa do seu monobiofilme foi superior às biomassas dos biofilmes das associações, exceto após 96 horas, onde observamos que a associação apresentou biomassa superior ao monobiofilme de *P. intermedia* 17. Não observamos diferenças do biofilme misto de *P. intermedia* e *P. gingivalis* W83 com *P. intermedia* e PgW83Δ0637.

A associação entre as cepas de *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741 com *P. intermedia* 17 também está demonstrada na Figura 9 e na Tabela 9. A associação com *P. intermedia* 17 apresentou-se benéfica para *P. gingivalis* ATCC33277 logo nas primeiras 48 horas, já para Pg33277Δ0741, esse benefício apresentou-se logo nas primeiras 24 horas. Diferentemente dos resultados encontrados nos monobiofilme entre *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741, onde houve redução da biomassa do biofilme da linhagem mutante em todos os intervalos de tempo avaliados, a presença de *P. intermedia* 17 minimizou essa redução, sendo que só foi verificada diferença entre as biomassas dos biofilmes mistos nas primeiras 24 horas, sugerindo que a presença de *P. intermedia* 17 possa compensar o biofilme de Pg33277Δ0741 em relação à *P. gingivalis* ATCC33277.

Para *P. intermedia* 17, a associação com as cepas de *P. gingivalis* não foi benéfica, visto que os valores das biomassas na associação foram inferiores aos apresentados nos monobiofilmes, no entanto, esse achado não ocorreu em todos os intervalos de tempo avaliados e não ocorreu uniformemente em todas as cepas. Esses resultados diferem, em parte, com os resultados encontrados por Barbosa (2013) no qual se verificou benefício para ambas as espécies na associação *P. gingivalis* W83 e *P. intermedia* 17, após 24 horas de formação de biofilme. Pequenas diferenças na metodologia podem explicar diferenças nos resultados de Barbosa (2013), como o meio de cultura (Todd Hewitt) e o tempo de crescimento da cultura (12 h) utilizados.

Figura 11 - Quantificação (A_{490nm}) da biomassa do biofilme de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637, *P. gingivalis* ATCC33277, Pg33277Δ0741 com *P. intermedia* 17, ao longo do tempo. Barras representam o desvio padrão das amostras.

Tabela 9 - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações dos monobiofilmes de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741 com *P. intermedia* 17, ao longo do tempo. Significância: valor $p < 0,05$.

Biofilmes	valores de p			
	24h	48h	72h	96h
<i>P. gingivalis</i> W83 x PgW83Δ0637	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x Pg33277Δ0741	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. gingivalis</i> W83 x <i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> W83	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
PgW83Δ0637 x <i>P. intermedia</i> 17 + PgW83Δ0637	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x <i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	< 0.05	< 0.05	ns	ns
Pg33277Δ0741 x <i>P. intermedia</i> 17 + Pg33277Δ0741	ns	ns	< 0.05	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> W83 x <i>P. intermedia</i> 17 + PgW83Δ0637	ns	ns	ns	ns
<i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x <i>P. intermedia</i> 17 + Pg33277Δ0741	ns	ns	< 0.05	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> W83	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. intermedia</i> 17 + PgW83Δ0637	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. intermedia</i> 17 + Pg33277Δ0741	< 0.05	< 0.05	ns	ns

Analisando a Figura 12 e Tabela 10, observamos que não houve diferença significativa entre os monobiofilmes formados entre *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380, ao longo do tempo. No entanto, observamos que houve redução significativa na capacidade de formação de monobiofilme de Pg33277Δ0531 em todos os intervalos de tempo avaliados em relação à cepa selvagem *P. gingivalis* ATCC33277, demonstrando que em *P. gingivalis* ATCC33277 *fvW* pode estar associado com a formação do monobiofilme. Nossos resultados mostram, ainda, que esse gene deve exercer funções diferentes em cepas distintas.

Quando comparamos os biofilmes mistos com os monobiofilmes, observamos que a presença de *S. gordonii* DL1 promoveu alterações negativas, já que houve diminuição da biomassa dos biofilmes mistos em relação aos monobiofilmes tanto nas cepas selvagens *P. gingivalis* W83 e *P. gingivalis* ATCC33277 quanto nas linhagens mutantes PgW83Δ1380 e Pg33277Δ0531, sendo que essa influência foi mais notável em *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380, pois foi encontrada em todos os intervalos de tempo avaliados. No entanto, para *S. gordonii*, a associação com as cepas de *P. gingivalis* promoveu aumento da biomassa do biofilme, pois os valores dos biofilmes mistos foram superiores aos apresentados pelo seu monobiofilme, exceto na associação com Pg33277Δ0531, onde esse benefício só foi encontrado nas primeiras 24 horas.

A presença de *S. gordonii* não promoveu diferenças entre os biofilmes mistos de *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380, mas em *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531, houve diferença na biomassa em todos os intervalos avaliados, demonstrando que, assim como no monobiofilme, *fvW* parece ter envolvimento na formação do biofilme misto de *P. gingivalis* ATCC33277 na presença de *S. gordonii*.

Figura 12 - Quantificação (A_{490nm}) da biomassa do biofilme de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ1380, *P. gingivalis* ATCC33277, Pg33277Δ0531 com *S. gordonii* DL1, ao longo do tempo. Barras representam o desvio padrão das amostras.

Tabela 10 - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações dos monobiofilmes de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ1380, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531 com *S. gordonii* DL1, ao longo do tempo. Significância: valor $p < 0,05$.

Biofilmes	valores de p			
	24h	48h	72h	96h
<i>P. gingivalis</i> W83 x PgW83Δ1380	ns	ns	ns	ns
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x Pg33277Δ0531	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. gingivalis</i> W83 x <i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> W83	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
PgW83Δ1380 x <i>S. gordonii</i> DL1 + PgW83Δ1380	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x <i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Pg33277Δ0531 x <i>S. gordonii</i> DL1 + Pg33277Δ0531	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> W83 x <i>S. gordonii</i> DL1 + PgW83Δ1380	ns	ns	ns	ns
<i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x <i>S. gordonii</i> DL1 + Pg33277Δ0531	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>S. gordonii</i> DL1 x <i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> W83	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>S. gordonii</i> DL1 x <i>S. gordonii</i> DL1 + PgW83Δ1380	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>S. gordonii</i> DL1 x <i>S. gordonii</i> DL1 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	ns	ns	ns	< 0.05
<i>S. gordonii</i> DL1 x <i>S. gordonii</i> DL1 + Pg33277Δ0531	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ns

A análise da Figura 13 e Tabela 11 nos permite afirmar que a presença de *P. intermedia* promoveu redução na formação de biofilme de *P. gingivalis* W83, já que a biomassa apresentada pelo biofilme misto reduziu em relação ao monobiofilme de *P. gingivalis* W83, a partir de 48 horas. Em relação à PgW83Δ1380, os dados apontam para redução da biomassa no biofilme misto em comparação ao monobiofilme nos intervalos de 48 e 72 horas. Contrariamente aos dados apresentados por *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380, em *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531 a presença de *P. intermedia* foi positiva, já que as biomassas dos biofilmes mistos foram superiores às biomassas dos monobiofilmes, sendo que em *P. gingivalis* ATCC33277 essa influência só não foi significativa nas primeiras 24 horas e em Pg33277Δ0531 foi verificada em todos os intervalos de tempo avaliados. A associação positiva entre *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* ATCC33277 confirmam os resultados de Kamaguchi et al., (2003), apesar dos autores terem usado a cepa *P. intermedia* ATCC 25611, e demonstram que as diferenças existentes entre *P. gingivalis* ATCC33277 e *P. gingivalis* W83 podem se manifestar na associação com *P. intermedia* 17.

Comparando os biofilmes mistos das cepas selvagens com o das linhagens mutantes, verificamos que em PgW83Δ1380 houve diferença da biomassa (aumento) apenas após 96 horas de formação de biofilme em relação à *P. gingivalis* W83. No entanto, em Pg33277Δ0531 observamos redução da biomassa do biofilme misto em todos os intervalos em comparação à *P. gingivalis* ATCC33277. Esses dados sugerem que em *P. gingivalis* ATCC33277 *fvW* tenha envolvimento na formação de biofilme misto também com *P. intermedia* 17.

Para *P. intermedia* a associação com *P. gingivalis* não foi positiva, já que o valor das biomassas dos biofilmes mistos foi bem inferior à biomassa apresentada pelo seu monobiofilme.

Figura 13 - Quantificação (A_{490nm}) da biomassa do biofilme de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ1380, *P. gingivalis* ATCC33277, Pg33277Δ0531 com *P. intermedia* 17, ao longo do tempo. Barras representam o desvio padrão das amostras.

Tabela 11 - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações dos monobiofilmes de *P. gingivalis* W83, PgW83Δ1380, *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531 com *P. intermedia* 17, ao longo do tempo. Significância: valor $p < 0,05$.

Biofilmes	valores de p			
	24h	48h	72h	96h
<i>P. gingivalis</i> W83 x PgW83Δ1380	ns	ns	ns	ns
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x Pg33277Δ0531	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. gingivalis</i> W83 x <i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> W83	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
PgW83Δ1380 x <i>P. intermedia</i> 17 + PgW83Δ1380	ns	< 0.05	< 0.05	ns
<i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x <i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	< 0.05	< 0.05	ns	ns
Pg33277Δ0531 x <i>P. intermedia</i> 17 + Pg33277Δ0531	ns	< 0.05	ns	ns
<i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> W83 x <i>P. intermedia</i> 17 + PgW83Δ1380	ns	ns	ns	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277 x <i>P. intermedia</i> 17 + Pg33277Δ0531	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> W83	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. intermedia</i> 17 + PgW83Δ1380	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. intermedia</i> 17 + <i>P. gingivalis</i> ATCC33277	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. intermedia</i> 17 + Pg33277Δ0531	ns	ns	ns	< 0.05

Analisando os dados encontrados na coagregação e formação de monobiofilme, podemos afirmar que apesar de serem considerados eventos complementares, a capacidade autoagregativa superior das linhagens mutantes em relação à cepa selvagem resultou em uma menor biomassa em períodos posteriores em *P. gingivalis* ATCC33277, já que Pg33277Δ0741 e Pg33277Δ0531 apresentaram taxa de autoagregação superior à *P. gingivalis* ATCC33277 e apresentaram biomassa de monobiofilme inferior à cepa selvagem. PgW83Δ0637 apresentou taxa de autoagregação inferior à *P. gingivalis* W83 e apresentou maior biomassa de monobiofilme. Ainda podemos citar que PgW83Δ1380 apresentou taxa de coagregação semelhante à *P. gingivalis* W83 e os valores de biomassa do monobiofilme também foram semelhantes. Assim, no presente estudo, os eventos iniciais na formação do biofilme, como a capacidade agregativa, apesar de serem consideradas etapas importantes na formação de biofilme (Darveau et al., 1997; Kolenbrander, 2011; Rickard et al., 2003; Wright et al., 2013), não resultaram no aumento de volume da biomassa nos períodos posteriores.

Esses achados podem ser estendidos para a coagregação e biofilmes mistos, já que encontramos elevadas taxas de coagregação entre *P. intermedia* e *P. gingivalis* W83, PgW83Δ0637 e PgW83Δ1380 e a biomassa dos biofilmes mistos entre as espécies diminuiu em relação aos seus monobiofilmes. Reforçando, as taxas de coagregação entre *P. intermedia* e Pg33277Δ0741 e *P. intermedia* e Pg33277Δ0531 foram mais elevadas do que entre *P. intermedia* e *P. gingivalis* ATCC33277, ao contrário da biomassa do biofilme misto no qual a associação de *P. intermedia* com *P. gingivalis* ATCC33277 apresentou maior valor de biomassa. Provavelmente outros eventos que ocorrem em períodos mais tardios superaram a capacidade coagregativa dos genes deletados.

Os genes PGN0741/Pg0637 e PGN0531/Pg1380 em *P. gingivalis* ATCC33277 e *P. gingivalis* W83 precisam ser melhor investigados para que suas funções na coagregação e suas conseqüências nos biofilmes mistos de *P. gingivalis* com *S. gordonii* e *P. intermedia* sejam melhor esclarecidos.

Os dados demonstram funções diferentes do receptor dependente de TonB em diferentes cepas de *P. gingivalis* no que diz respeito à capacidade de formação de monobiofilme, já que em *P. gingivalis* W83 a deleção do gene provocou aumento da capacidade de formação de monobiofilme e em *P. gingivalis* ATCC33277, a deleção provocou redução dessa capacidade. Em relação ao biofilme misto, o receptor dependente de TonB

parece não ter tido influência, independentemente da associação com *S. gordonii* ou com *P. intermedia*, já que em ambas as linhagens mutantes testadas, os valores de biomassa da cepa padrão e das linhagens mutantes foi muito parecido.

Existem poucos relatos na literatura sobre as funções dos genes selecionados para o estudo. Este estudo é um dos pioneiros no sentido de verificar a participação de TonB e de *fvW* tanto na formação como controle de fatores de virulência de *P. gingivalis*, como atividades agregativas e coagregativas, formação de biofilme monotípico ou heterotípico.

Em relação ao fator de von Willebrand tipo A (*fvW*), a deleção do gene parece não ter tido influência sobre *P. gingivalis* W83, pois os valores de autoagregação, biomassa de monobiofilme e de biofilme misto foram muito semelhantes aos apresentados pela cepa padrão. A taxa de coagregação de PgW83Δ1380 com *P. intermedia* em relação à *P. gingivalis* W83 apresentou diferença (74% versus 82,2%), mas essa diferença só foi verificada após 96 horas de formação de biofilme misto. No entanto para *P. gingivalis* ATCC 332277, a deleção do gene promoveu diferenças em relação à capacidade autoagregativa, coagregativa com *P. intermedia* e na capacidade de formação de monobiofilme e biofilme misto com *P. intermedia* e *S. gordonii*. Apesar de Pg33277Δ0531 ter apresentado uma taxa de coagregação com *S. gordonii* muito próxima à taxa apresentado por *P. gingivalis* ATCC33277 (27,2% versus 29,4%) parece ter sido suficiente para promover diferenças na capacidade de formação de biofilme misto com *S. gordonii* em relação à *P. gingivalis* ATCC33277. Esses resultados sugerem um envolvimento do *fvW* na capacidade autoagregativa de *P. gingivalis* ATCC33277 e isso se reflete na sua capacidade de formação de monobiofilme e biofilme misto, diferentemente do que ocorre com *Streptococcus agalactiae*, onde sua função está relacionada com a adesão de PilA a células epiteliais e não com a formação de biofilme (Konto-Ghiorgi et al., 2009).

4.7 Determinação da capacidade de adesão, invasão e persistência de *P. gingivalis* a células endoteliais da artéria coronária humana (HCAEC)

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de adesão e invasão das cepas de *P. gingivalis* às células endoteliais da artéria coronária humana (HCAEC). Apesar da diferença de comportamento verificada entre *P. gingivalis* ATCC33277 e sua linhagem mutante Pg33277Δ0531, essa diferença só foi significativa no período de 30 minutos de

contato, enquanto que nos eventos posteriores só foi verificada uma tendência de redução da interação da linhagem mutante. Observamos que a linhagem mutante PgW83Δ1380 apresentou redução na capacidade adesiva em relação à cepa selvagem *P. gingivalis* W83, já que houve diferença significativa após 30 minutos e 1 h30 minutos de contato com HCAEC. No entanto na invasão não observamos diferenças entre as cepas, fato também observado entre *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531. Analisando os dados após 24 h, no qual avaliamos a capacidade de persistência no interior das HCAEC, observamos que houve diferença entre as cepas selvagens e as linhagens mutantes, mas essa diferença só foi significativa entre *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380.

Tabela 12 – Quantificação relativa (número de vezes) das cepas de *P. gingivalis* em ensaios de interação total, invasão e persistência em células endoteliais da artéria coronária humana.

	<i>P. gingivalis</i> ATCC33277/Pg33277Δ0531	<i>P. gingivalis</i> W83/PgW83Δ1380
30 min	2,3*	1,6*
1 h30 min	2,6	1,5*
2 h30 min	1,6	1,1
24 h	2,7	1,9*

* $p \leq 0,05$

Comparando as cepas selvagens com as linhagens mutantes, observamos uma mesma tendência, na adesão após 30 minutos de contato encontramos uma diferença entre as cepas selvagens com as linhagens mutantes, após 1 h30 minutos, essa diferença se acentuou ou se manteve, mas após o tratamento com antibiótico, as bactérias não invadidas foram mortas e apenas as internalizadas sobreviveram, nesse momento observamos em ambas as comparações, que a diferença existente entre cepa selvagem e linhagem mutante, nos dois intervalos anteriores, diminuiu ou foi equiparada. Após 24 h de contato, novamente observamos um aumento da quantidade de bactérias selvagens em relação à quantidade de bactérias da linhagem mutante, ou seja, a cepa selvagem conseguiu sobreviver por mais tempo no interior das HCAEC que a linhagem mutante, em ambas as cepas padrões de *P. gingivalis*.

Os resultados sugerem que, assim como ocorreu com a deleção do *fvW* em *S. agalactiae*, no qual a adesão a células epiteliais de duas origens diferentes foi prejudicada

(Konto-Ghiorgi et al., 2009), *fvW* possa ter envolvimento nos eventos de adesão de *P. gingivalis* a HCAEC, nas duas cepas de *P. gingivalis* utilizadas.

A invasão de *P. gingivalis* ocorre pela via endocítica (Deshpande et al., 1998; Dorn et al., 2001) e em ambas as cepas testadas não foi alterada pela deleção do *fvW*, mas é possível que após a internalização, *fvW* possa auxiliar a bactéria no tráfego no interior da célula, auxiliando a sobrevivência de *P. gingivalis*. Apesar das cepas de *P. gingivalis* seguirem por vias distintas após a invasão a HCAEC, *P. gingivalis* W83 segue a via dos autofagossomos (Kabeya et al., 2000) enquanto *P. gingivalis* ATCC33277 segue a via dos endossomos/lisossomos (Rodrigues et al., 2012), *fvW* parece ter importância para ambas as cepas, já que encontramos diferença na quantidade de bactérias persistentes entre selvagem e mutante, esses eventos podem resultar em importante mecanismo para sobrevivência de *P. gingivalis*, já que a bactéria possui habilidade para sair da célula e colonizar os tecidos, incluindo a parede dos vasos, podendo contribuir, dessa forma, para a aterosclerose *in vivo* (Rodrigues et al., 2012).

5 CONCLUSÕES

- A presença de *S. gordonii* foi capaz de alterar o perfil de expressão gênica de *P. gingivalis*, mesmo nos estágios iniciais de formação de biofilme entre as espécies.
- A concentração de ferro modulou o biofilme de *P. gingivalis*. O gene TonB (PGN0741/PG0637) mostrou-se importante na modulação do biofilme de *P. gingivalis* ATCC33277, mas em *P. gingivalis* W83 esse papel não ficou tão evidente. O papel do gene *fvW* (PGN0531/PG1380) na modulação do biofilme em diferentes concentrações de ferro não ficou esclarecido.
- A capacidade coagregativa com *P. intermedia* foi afetada nas duas linhagens mutantes de *P. gingivalis* W83 (PgW83Δ0637 e PgW83Δ1380), mas em *P. gingivalis* ATCC33277 esse resultado não foi confirmado, pelo contrário, tanto a capacidade coagregativa quanto a autoagregativa das duas linhagens mutantes (Pg33277Δ0741 e Pg33277Δ0531) aumentaram, demonstrando que a participação de TonB e *fvW* nos eventos coagregativos de *P. gingivalis* com *P. intermedia* é cepa específica. A presença de *S. gordonii* não afetou a capacidade coagregativa das cepas de *P. gingivalis* e suas respectivas linhagens mutantes.
- Em *P. gingivalis* ATCC33277, tanto o gene TonB quanto o gene *fvW* foram importantes na modulação dos monobiofilmes e dos biofilmes mistos com *S. gordonii* e *P. intermedia*, mas em *P. gingivalis* W83, essa modulação não ficou evidente em nenhuma das linhagens mutantes, demonstrando mais uma vez que as diferenças entre as cepas de *P. gingivalis* também ocorrem na formação dos biofilmes.
- O gene *fvW* foi importante para a adesão a células endoteliais tanto em *P. gingivalis* W83 quanto em *P. gingivalis* ATCC33277, mas sua influência na persistência só foi observada em *P. gingivalis* W83.
- Este trabalho confirmou a necessidade do uso de diferentes cepas de *P. gingivalis* no estudo do papel de genes em ensaios experimentais.

REFERÊNCIAS*

- Abbas A, Adams C, Scully N, Glennon J, O’Gara F. A role for TonB1 in biofilm formation and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 2007;274:269–78.
- Abe N, Baba A, Takii R, Nakayama K, Kamaguchi A, Shibata Y, et al. Roles of Arg- and Lys- gingipains in coaggregation of *Porphyromonas gingivalis*: identification of its responsible molecules in translation products of *rgpA*, *kgp*, and *hagA* genes. Biol Chem. 2004;385(11):1041-7.
- Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. J Periodontal Res. 2010;45(3):389-95.
- Abou-Raya S, Naeem A, Abou-El KH, El BS. Coronary artery disease and periodontal disease: is there a link? Angiology. 2002;53(2):141-8.
- Allen JD, Giordano T, Kevil CG. Nitrite and nitric oxide metabolism in peripheral artery disease. Nitric Oxide. 2012;26(4):217-22.
- Amano A, Sharma A, Sojar HT, Kuramitsu HK, Genco RJ. Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 1994;62(10):4682-5.
- Amano A, Fujiwara T, Nagata H, Kuboniwa M, Sharma A, Sojar HT, et al. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae mediate coaggregation with *Streptococcus oralis* through specific domains. J Dent Res. 1997;76(4):852-7.
- Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1426-30.
- Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. J Dent Res. 2000;79(9):1664-8.
- Amano A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol. 2003;74(1):90-6.
- Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. J Periodontal Res. 2004;39(2):136-42.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: Sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontology* 2000. 2010;52:12-37.

Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiriones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(2-3):215-37.

Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *J Dent Res.* 2006;85(5):392-403.

Asikainen S, Chen C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 1999;20:65-81.

Bacic M, Parker AC, Stagg J, Whitley HP, Wells WG, Jacob LA, et al. Genetic and structural analysis of the *Bacteroides* conjugative transposon CTn341. *J Bacteriol.* 2005;187(8):2858-69.

Baldwin ET, Sarver RW, Bryant GL, Jr., Curry KA, Fairbanks MB, Finzel BC, et al. Cation binding to the integrin CD11b I domain and activation model assessment. *Structure.* 1998;6(7):923-35.

Barbosa GM. Interações de isolados clínicos de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* com *Porphyromonas gingivalis* na formação de biofilmes. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Bélanger M, Rodrigues P, Progulske-Fox A. Genetic manipulation of *Porphyromonas gingivalis*. *Curr Protoc Microbiol.* 2007;Chapter 13:Unit13C.2.

Bélanger M, Kozarov E, Song H, Whitlock J, Progulske-Fox A. Both the unique and repeat regions of the *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin A are involved in adhesion and invasion of host cells. *Anaerobe.* 2012;18(1):128-34.

Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1978;80:1-35.

Byrne DP, Potempa J, Olczak T, Smalley JW. Evidence of mutualism between two periodontal pathogens: co-operative haem acquisition by the HmuY haemophore of *Porphyromonas gingivalis* and the cysteine protease interpain A (InpA) of *Prevotella intermedia*. *Mol Oral Microbiol.* 2013;28(3):219-29.

Cavrini F, Sambri V, Moter A, Servidio D, Marangoni A, Montebugnoli L, et al. Molecular detection of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in carotid and aortic atheromatous plaques by FISH: report of two cases. *J Med Microbiol.* 2005;54(Pt 1):93-6.

Chen T, Nakayama K, Belliveau L, Duncan MJ. *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect Immun.* 2001;69(5):3048-56.

Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K, Abbey K, Fleischmann RD, Walling J, et al. Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol. 2004;186(16):5473-9.

Chimento DP, Mohanty AK, Kadner RJ, Wiener MC. Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB. Nat Struct Biol. 2003;10(5):394-401.

Chu L, Bramanti TE, Ebersole JL, Holt SC. Hemolytic activity in the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*: kinetics of enzyme release and localization. Infect Immun. 1991;59(6):1932-40.

Chung WO, Demuth DR, Lamont RJ. Identification of a *Porphyromonas gingivalis* receptor for the *Streptococcus gordonii* SspB protein. Infect Immun. 2000;68(12):6758-62.

Cisar JO, Kolenbrander PE, McIntire FC. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. Infect Immun. 1979;24(3):742-52.

Cook GS, Costerton JW, Lamont RJ. Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. J Periodontal Res. 1998;33(6):323-7.

Cursino L, Li Y, Zaini PA, De La Fuente L, Hoch HC, Burr TJ. Twitching motility and biofilm formation are associated with *tonB1* in *Xylella fastidiosa*. FEMS Microbiol Lett. 2009;299:193-9.

Daep CA, Novak EA, Lamont RJ, Demuth DR. Structural dissection and in vivo effectiveness of a peptide inhibitor of *Porphyromonas gingivalis* adherence to *Streptococcus gordonii*. Infect Immun. 2011;79(1):67-74.

Dalman MR, Deeter A, Nimishakavi G, Duan ZH. Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. BMC Bioinformatics. 2012;13 Suppl 2:S11.

Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000. 1997;14:12-32.

Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. Nat Rev Microbiol. 2010;8(7):481-90.

Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 1998;66(11):5337-43.

Dorn BR, Dunn WA, Progulski-Fox A. *Porphyromonas gingivalis* traffics to autophagosomes in human coronary artery endothelial cells. Infect Immun. 2001;69(9):5698-708.

Dramsi S, Caliot E, Bonne I, Guadagnini S, Prévost MC, Kojadinovic M, et al. Assembly and role of pili in group B streptococci. Mol Microbiol. 2006;60(6):1401-13.

- Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun*. 1993;61(5):2260-5.
- Durso SC, Vieira LM, Cruz JN, Azevedo CS, Rodrigues PH, Simionato MR. Sucrose substitutes affect the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* biofilms. *Caries Res*. 2014;48(3):214-22.
- Enersen M, Nakano K, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Oral Microbiol*. 2013;5.
- Gibbs RS, Schrag S, Schuchat A. Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol*. 2004;104(5 Pt 1):1062-76.
- Goulbourne PA, Ellen RP. Evidence that *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J Bacteriol*. 1991;173(17):5266-74.
- Grenier D. Demonstration of a bimodal coaggregation reaction between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7(5):280-4.
- Grenier D, Mayrand D. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun*. 1987;55(1):111-7.
- Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*. 2012;6(6):1176-85.
- Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *J Clin Periodontol*. 1992;19(2):84-91.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:78-111.
- Hall LM, Fawell SC, Shi X, Faray-Kele MC, Aduse-Opoku J, Whiley RA, et al. Sequence diversity and antigenic variation at the rag locus of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*.
- Hamada N, Watanabe K, Sasakawa C, Yoshikawa M, Yoshimura F, Umemoto T. Construction and characterization of a *fimA* mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 1994;62(5):1696-704.
- Hamada N, Watanabe K, Arai M, Hiramane H, Umemoto T. Cytokine production induced by a 67-kDa fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(3):197-200.
- Hajishengallis G. Immune evasion strategies of *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Biosci*. 2011;53(3):233-40.

Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012;27(6):409-19.

Higashi D, Barbosa Gm, Kfoury, LS, Simionato, MRL. Genes from clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* are differentially expressed in biofilms. In General Meeting of The American Society for Microbiology; 2009, Philadelphia. Philadelphia: American Society for Microbiology; 2009. v125, p172.

Hiramine H, Watanabe K, Hamada N, Umemoto T. *Porphyromonas gingivalis* 67-kDa fimbriae induced cytokine production and osteoclast differentiation utilizing TLR2. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;229(1):49-55.

Hiratsuka K, Abiko Y, Hayakawa M, Ito T, Sasahara H, Takiguchi H. Role of *Porphyromonas gingivalis* 40-kDa outer membrane protein in the aggregation of *P. gingivalis* vesicles and *Actinomyces viscosus*. *Arch Oral Biol.* 1992;37(9):717-24.

Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000.* 1999;20:168-238.

Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005;38:72-122.

Igboin CO, Griffen AL, Leys EJ. *Porphyromonas gingivalis* strain diversity. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3073-81.

Ito R, Ishihara K, Shoji M, Nakayama K, Okuda K. Hemagglutinin/Adhesin domains of *Porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *Treponema denticola*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;60(3):251-60.

Jiao Y, Hasegawa M, Inohara N. The Role of Oral Pathobionts in Dysbiosis during Periodontitis Development. *J Dent Res.* 2014.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19(21):5720-8.

Kadner RJ. Vitamin B12 transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. *Mol Microbiol.* 1990;4(12):2027-33.

Kadowaki T, Nakayama K, Yoshimura F, Okamoto K, Abe N, Yamamoto K. Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem.* 1998;273(44):29072-6.

Kamaguchi A, Ohyama T, Sakai E, Nakamura R, Watanabe T, Baba H, et al. Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. Microbiology. 2003;149(Pt 5):1257-64.

Katz J, Yang QB, Zhang P, Potempa J, Travis J, Michalek SM, et al. Hydrolysis of epithelial junctional proteins by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. Infect Immun. 2002;70(5):2512-8.

Kinder SA, Holt SC. Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. Infect Immun. 1989;57(11):3425-33.

Kolenbrander PE. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. Annu Rev Microbiol. 1988;42:627-56.

Kolenbrander PE. Surface recognition among oral bacteria: multigeneric coaggregations and their mediators. Crit Rev Microbiol. 1989;17(2):137-59.

Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol. 1993;175(11):3247-52.

Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. Periodontol 2000. 2006;42:47-79.

Kolenbrander PE. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. Int J Oral Sci. 2011;3(2):49-54.

Konto-Ghiorghi Y, Mairey E, Mallet A, Dumenil G, Caliot E, Trieu-Cuot P, et al. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. PLoS Pathog. 2009;5(5):e1000422.

Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA, Jr., Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25. United States 2005. p. e17-8.

Kuboniwa M, Inaba H, Amano A. Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. Periodontol 2000. 2010;54(1):136-59.

Kuramitsu HK, Kang IC, Qi M. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implications for cardiovascular diseases. J Periodontol. 2003;74(1):85-9.

Lamont RJ, Oda D, Persson RE, Persson GR. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. Oral Microbiol Immunol. 1992;7(6):364-7.

Lamont RJ, Hsiao GW, Gil S. Identification of a molecule of *Porphyromonas gingivalis* that binds to *Streptococcus gordonii*. Microb Pathog. 1994;17(5):355-60.

Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*. 1995;63(10):3878-85.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(4):1244-+.

Lamont RJ, Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(6):341-9.

Lamont RJ, El-Sabaeny A, Park Y, Cook GS, Costerton JW, Demuth DR. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology*. 2002;148(Pt 6):1627-36.

Lamont RJ, Yilmaz O. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol* 2000. 2002;30:61-9.

Levesque C, Lamothe J, Frenette M. Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with periodontopathogens: evidence for involvement of fimbriae in the interaction with *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(5):333-7.

Libby P. Atheroma: more than mush. *Lancet*. 1996;348 Suppl 1:s4-7.

Lin X, Wu J, Xie H. *Porphyromonas gingivalis* minor fimbriae are required for cell-cell interactions. *Infect Immun*. 2006;74(10):6011-5.

Litwin CM, Calderwood SB. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6(2):137-49.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(20):2520-44.

Lundrigan MD, Kadner RJ. Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. *J Biol Chem*. 1986;261(23):10797-801.

Maeda K, Nagata H, Kuboniwa M, Kataoka K, Nishida N, Tanaka M, et al. Characterization of binding of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun*. 2004;72(9):5475-7.

Maeda K, Nagata H, Yamamoto Y, Tanaka M, Tanaka J, Minamino N, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun*. 2004;72(3):1341-8.

Maeda K, Nagata H, Kuboniwa M, Ojima M, Osaki T, Minamino N, et al. Identification and characterization of *Porphyromonas gingivalis* client proteins that bind to *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun*. 2013;81(3):753-63.

Maisey HC, Hensler M, Nizet V, Doran KS. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J Bacteriol*. 2007;189(4):1464-7.

Marchesan JT, Morelli T, Lundy SK, Jiao Y, Lim S, Inohara N, et al. Divergence of the systemic immune response following oral infection with distinct strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol*. 2012;27(6):483-95.

Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(1):71-109.

Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*. 2004;38(3):204-11.

Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*. 2006;6 Suppl 1:S14.

McIntire FC, Vatter AE, Baros J, Arnold J. Mechanism of coaggregation between *Actinomyces viscosus* T14V and *Streptococcus sanguis* 34. *Infect Immun*. 1978;21(3):978-88.

Ménard C, Mouton C. Clonal diversity of the taxon *Porphyromonas gingivalis* assessed by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Infect Immun*. 1995;63(7):2522-31.

Metzger Z, Blasbalg J, Dotan M, Weiss EI. Enhanced attachment of *Porphyromonas gingivalis* to human fibroblasts mediated by *Fusobacterium nucleatum*. *J Endod*. 2009;35(1):82-5.

Metzger Z, Blasbalg J, Dotan M, Tsesis I, Weiss EI. Characterization of coaggregation of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 with six *Porphyromonas gingivalis* strains. *J Endod*. 2009;35(1):50-4.

Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MP. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(4):224-9.

Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *J Immunol Res*. 2014;2014.

Nadkarni MA, Chhour KL, Browne G, Jacques NA, Hunter N. Lysine gingipain (kgp) biovars of *Porphyromonas gingivalis* exhibit differential distribution on oral mucosal sites. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3350-2.

Nadkarni MA, Browne GV, Chhour KL, Byun R, Nguyen KA, Chapple CC, et al. Pattern of distribution of *Prevotella* species/phylotypes associated with healthy gingiva and periodontal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(11):2989-99.

Naito M, Sato K, Shoji M, Yukitake H, Ogura Y, Hayashi T, et al. Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer. *Microbiology*. 2011;157(Pt 7):2022-32.

Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of fimA gene. *J Clin Microbiol*. 2000;38(5):1909-14.

Nakagawa I, Amano A, Kuboniwa M, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect Immun*. 2002;70(1):277-85.

Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S, et al. Identification of a new variant of fimA gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. *J Periodontal Res*. 2002;37(6):425-32.

Nakagawa I, Amano A, Inaba H, Kawai S, Hamada S. Inhibitory effects of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae on interactions between extracellular matrix proteins and cellular integrins. *Microbes Infect*. 2005;7(2):157-63.

Nakayama K. Molecular genetics of *Porphyromonas gingivalis*: gingipains and other virulence factors. *Curr Protein Pept Sci*. 2003;4(6):389-95.

Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol*. 2003;185(18):5591-601.

Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol*. 2001;72(9):1221-7.

Nobbs AH, Rosini R, Rinaudo CD, Maione D, Grandi G, Telford JL. Sortase A utilizes an ancillary protein anchor for efficient cell wall anchoring of pili in *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*. 2008;76(8):3550-60.

Ogawa T. Chemical structure of lipid A from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* lipopolysaccharide. *FEBS Lett*. 1993;332(1-2):197-201.

Ogawa T, Uchida H, Hamada S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and their synthetic peptides induce proinflammatory cytokines in human peripheral blood monocyte cultures. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;116(2):237-42.

Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(1):119-44.

- Olczak T, Maszczak-Seneczko D, Smalley JW, Olczak M. Gallium(III), cobalt(III) and copper(II) protoporphyrin IX exhibit antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* by reducing planktonic and biofilm growth and invasion of host epithelial cells. *Arch Microbiol.* 2012;194(8):719-24.
- Okuda T, Kokubu E, Kawana T, Saito A, Okuda K, Ishihara K. Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella*. *Anaerobe.* 2012;18(1):110-6.
- Park Y, Simionato MR, Sekiya K, Murakami Y, James D, Chen W, et al. Short fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and their role in coadhesion with *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun.* 2005;73(7):3983-9.
- Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Riley PF, Reynolds EC. Characterization of proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology.* 2006;152(Pt 8):2381-94.
- Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, et al. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(10):3697-702.
- Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(14):e73.
- Periasamy S, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol.* 2009;191(22):6804-11.
- Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer TH, Travis J. Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 1996;178(10):2876-82.
- Polak D, Shapira L, Weiss EI, Houry-Haddad Y. The role of coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* on the host response to mixed infection. *J Clin Periodontol.* 2012;39(7):617-25.
- Ponting CP, Aravind L, Schultz J, Bork P, Koonin EV. Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *J Mol Biol.* 1999;289(4):729-45.
- Potempa J, Travis J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases in periodontitis, a review. *Acta Biochim Pol.* 1996;43(3):455-65.
- Potempa J, Banbula A, Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000.* 2000;24:153-92.

Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr Protein Pept Sci*. 2003;4(6):397-407.

Progulske-Fox A, Kozarov E, Dorn B, Dunn W, Burks J, Wu Y. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors and invasion of cells of the cardiovascular system. *J Periodontal Res*. 1999;34(7):393-9.

Rafferty B, Jönsson D, Kalachikov S, Demmer RT, Nowygrod R, Elkind MS, et al. Impact of monocytic cells on recovery of uncultivable bacteria from atherosclerotic lesions. *J Intern Med*. 2011;270(3):273-80.

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol*. 2003;11(2):94-100.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997;336(14):973-9.

Rodrigues PH, Reyes L, Chadda AS, Belanger M, Wallet SM, Akin D, et al. *Porphyromonas gingivalis* strain specific interactions with human coronary artery endothelial cells: a comparative study. *PLoS One*. 2012;7(12):e52606.

Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect*. 2000;2(13):1599-607.

Rosen G, Sela MN. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* PK 1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;256(2):304-10.

Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res*. 2005;84(1):59-63.

Sato T, Nakazawa F. Coaggregation between *Prevotella oris* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012.

Schifferle RE, Shostad SA, Bayers-Thering MT, Dyer DW, Neiders ME. Effect of protoporphyrin IX limitation on *Porphyromonas gingivalis*. *J Endod*. 1996;22(7):352-5.

Schramm E, Mende J, Braun V, Kamp RM. Nucleotide sequence of the colicin B activity gene cba: consensus pentapeptide among TonB-dependent colicins and receptors. *J Bacteriol*. 1987;169(7):3350-7.

Shen S, Samaranayake LP, Yip HK. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. *Arch Oral Biol*. 2005;50(1):23-32.

Simionato MR, Tucker CM, Kuboniwa M, Lamont G, Demuth DR, Tribble GD, et al. *Porphyromonas gingivalis* genes involved in community development with *Streptococcus gordonii*. Infect Immun. 2006;74(11):6419-28.

Simpson W, Olczak T, Genco CA. Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol. 2000;182(20):5737-48.

Slakeski N, Dashper SG, Cook P, Poon C, Moore C, Reynolds EC. A *Porphyromonas gingivalis* genetic locus encoding a heme transport system. Oral Microbiol Immunol. 2000;15(6):388-92.

Slots J, Gibbons RJ. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. Infect Immun. 1978;19(1):254-64.

Smalley JW, Byrne DP, Birss AJ, Wojtowicz H, Sroka A, Potempa J, et al. HmuY haemophore and gingipain proteases constitute a unique syntrophic system of haem acquisition by *Porphyromonas gingivalis*. PLoS One. 2011;6(2):e17182.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol. 1992;63(4 Suppl):322-31.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25(2):134-44.

Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. J Clin Periodontol. 2002;29(3):260-8.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005;38:135-87.

Sojar HT, Han Y, Hamada N, Sharma A, Genco RJ. Role of the amino-terminal region of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in adherence to epithelial cells. Infect Immun. 1999;67(11):6173-6.

Sojar HT, Sharma A, Genco RJ. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae bind to cytokeratin of epithelial cells. Infect Immun. 2002;70(1):96-101.

Sojar HT, Genco RJ. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of epithelial cells as a second molecule that binds to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;45(1):25-30.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol. 2002;56:187-209.

Sundqvist G, Figdor D, Hänström L, Sörlin S, Sandström G. Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. Scand J Dent Res. 1991;99(2):117-29.

- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. J Periodontol. 2001;72(10):1354-63.
- Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. Curr Vasc Pharmacol. 2012;10(1):4-18.
- Trevisan M, Dorn J. The relationship between periodontal disease (pd) and cardiovascular disease (cvd). Mediterr J Hematol Infect Dis. 2010;2(3):e2010030.
- Tribble GD, Lamont RJ. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. Periodontol 2000. 2010;52(1):68-83.
- Tribble GD, Kerr JE, Wang BY. Genetic diversity in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: molecular mechanisms and biological consequences. Future Microbiol. 2013;8(5):607-20.
- Tsuda K, Furuta N, Inaba H, Kawai S, Hanada K, Yoshimori T, et al. Functional analysis of alpha5beta1 integrin and lipid rafts in invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicles. Cell Struct Funct. 2008;33(1):123-32.
- Umemoto T, Hamada N. Characterization of biologically active cell surface components of a periodontal pathogen. The roles of major and minor fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontol. 2003;74(1):119-22.
- Van Peer G, Mestdagh P, Vandesompele J. Accurate RT-qPCR gene expression analysis on cell culture lysates. Sci Rep. 2012;2:222.
- Velsko IM, Chukkapalli SS, Rivera MF, Lee JY, Chen H, Zheng D, et al. Active invasion of oral and aortic tissues by *Porphyromonas gingivalis* in mice causally links periodontitis and atherosclerosis. PLoS One. 2014;9(5):e97811.
- Wakabayashi H, Kondo I, Kobayashi T, Yamauchi K, Toida T, Iwatsuki K, et al. Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin. Biometals. 2010;23(3):419-24.
- Wang HL, Greenwell H, Bissada NF. Crevicular fluid iron changes in treated and untreated periodontally diseased sites. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990;69(4):450-6.
- Wang M, Liang S, Hosur KB, Domon H, Yoshimura F, Amano A, et al. Differential virulence and innate immune interactions of Type I and II fimbrial genotypes of *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol Immunol. 2009;24(6):478-84.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol. 2000;182(10):2675-9.
- Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. Mol Oral Microbiol. 2013;28(2):83-101.

Xie H, Kozlova N, Lamont RJ. *Porphyromonas gingivalis* genes involved in *fimA* regulation. Infect Immun. 2004;72(2):651-8.

Yilmaz O, Verbeke P, Lamont RJ, Ojcius DM. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. Infect Immun. 2006;74(1):703-10.

Yoshino T, Laine ML, van Winkelhoff AJ, Dahlén G. Genotype variation and capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* from chronic periodontitis and periodontal abscesses. FEMS Microbiol Lett. 2007;270(1):75-81.

Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. Ann Periodontol. 1996;1(1):879-925.

Zhao Q, Li XZ, Mistry A, Srikumar R, Zhang L, Lomovskaya O, Poole K. Influence of the TonB energy-coupling protein on efflux-mediated multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:2225-31.

Zhao Q, Poole K. Differential effects of mutations in tonB1 on intrinsic multidrug resistance and iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2002;184:2045-9.

APÊNDICE A - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações entre os monobiofilmes de *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0741, nas diferentes concentrações de hemina (sem hemina, 1 µg/ml, 5 µg/ml e 15 µg/ml), e nos diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Significância valor $p < 0.05$.

Comparação	24h	48h	72h	96h
33277 X 33277Δ0741 Normal Sem Hemina	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 X 33277Δ0741 Normal 1µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 X 33277Δ0741 Normal 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 X 33277Δ0741 Normal 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 X 33277Δ0741 Sem Hemina Exaurido	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 X 33277Δ0741 Exaurido 1µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 X 33277Δ0741 Exaurido 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 X 33277Δ0741 Exaurido 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Normal Sem Hemina x 1µg	ns	< 0.05	ns	ns
33277 Normal Sem Hemina x 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Normal Sem Hemina x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Normal 1µg x 5µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
33277 Normal 1µg x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Normal 5µg x 15µg	ns	ns	ns	ns
33277 Exaurido Sem Hemina x 1µg	ns	ns	ns	ns
33277 Exaurido Sem Hemina x 5µg	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
33277 Exaurido Sem Hemina x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Exaurido 1µg x 5µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
33277 Exaurido 1µg x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Exaurido 5µg x 15µg	ns	ns	< 0.05	ns
33277Δ0741 Normal Sem Hemina x 1µg	ns	ns	ns	ns
33277Δ0741 Normal Sem Hemina x 5µg	ns	ns	< 0.05	< 0.05
33277Δ0741 Normal Sem Hemina x 15µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
33277Δ0741 Normal 1µg x 5µg	ns	ns	ns	< 0.05
33277Δ0741 Normal 1µg x 15µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
33277Δ0741 Normal 5µg x 15µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
33277Δ0741 Exaurido Sem Hemina x 1µg	ns	ns	ns	ns
33277Δ0741 Exaurido Sem Hemina x 5µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
33277Δ0741 Exaurido Sem Hemina x 15µg	< 0.05	ns	< 0.05	< 0.05
33277Δ0741 Exaurido 1µg x 15µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
33277Δ0741 Exaurido 1µg x 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	< 0.05
33277Δ0741 Exaurido 5µg x 15µg	ns	ns	ns	< 0.05
33277 Sem Hemina Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns
33277 1µg Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns
33277 5µg Normal x Exaurido	ns	ns	< 0.05	ns
33277 15µg Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns
33277Δ0741 Sem Hemina Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns
33277Δ0741 1µg Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns
33277Δ0741 5µg Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns
33277Δ0741 15µg Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns

APÊNDICE B - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações entre os monobiofilmes de *P. gingivalis* ATCC33277 e Pg33277Δ0531, nas diferentes concentrações de hemina (sem hemina, 1 µg/ml, 5 µg/ml e 15 µg/ml), e nos diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Significância valor $p < 0.05$.

Comparação	24h	48h	72h	96h
33277 X 33277Δ0531 Normal Sem Hemina	< 0.05	ns	< 0.05	ns
33277 X 33277Δ0531 Normal 1µg	ns	ns	< 0.05	ns
33277 X 33277Δ0531 Normal 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	< 0.05
33277 X 33277Δ0531 Normal 15µg	ns	ns	ns	ns
33277 X 33277Δ0531 Sem Hemina Exaurido	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ns
33277 X 33277Δ0531 Exaurido 1µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ns
33277 X 33277Δ0531 Exaurido 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	< 0.05
33277 X 33277Δ0531 Exaurido 15µg	< 0.05	ns	ns	ns
33277 Normal Sem Hemina x 1µg	ns	< 0.05	ns	ns
33277 Normal Sem Hemina x 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Normal Sem Hemina x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Normal 1µg x 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	< 0.05
33277 Normal 1µg x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Normal 5µg x 15µg	ns	< 0.05	ns	ns
33277 Exaurido Sem Hemina x 1µg	ns	ns	ns	ns
33277 Exaurido Sem Hemina x 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Exaurido Sem Hemina x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Exaurido 1µg x 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Exaurido 1µg x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Exaurido 5µg x 15µg	ns	ns	ns	ns
33277Δ0531 Normal Sem Hemina x 1µg	< 0.05	< 0.05	ns	ns
33277Δ0531 Normal Sem Hemina x 5µg	ns	< 0.05	< 0.05	ns
33277Δ0531 Normal Sem Hemina x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277Δ0531 Normal 1µg x 5µg	< 0.05	ns	ns	ns
33277Δ0531 Normal 1µg x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277Δ0531 Normal 5µg x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277Δ0531 Exaurido Sem Hemina x 1µg	ns	ns	ns	< 0.05
33277Δ0531 Exaurido Sem Hemina x 5µg	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
33277Δ0531 Exaurido Sem Hemina x 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277Δ0531 Exaurido 1µg x 15µg	ns	< 0.05	ns	ns
33277Δ0531 Exaurido 1µg x 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277Δ0531 Exaurido 5µg x 15µg	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
33277 Sem Hemina Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns
33277 1µg Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns
33277 5µg Normal x Exaurido	ns	ns	< 0.05	ns
33277 15µg Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns
33277Δ0531 Sem Hemina Normal x Exaurido	ns	ns	ns	< 0.05
33277Δ0531 1µg Normal x Exaurido	ns	< 0.05	ns	ns
33277Δ0531 5µg Normal x Exaurido	< 0.05	ns	ns	ns
33277Δ0531 15µg Normal x Exaurido	ns	ns	ns	ns

APÊNDICE C - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações entre os monobiofilmes de *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ0637, nas diferentes concentrações de hemina (sem hemina, 1 µg/ml, 5 µg/ml e 15 µg/ml), e nos diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Significância valor $p < 0.05$.

Comparação	24h	48h	72h	96h
W83 x W83Δ0637 Normal Sem Hemina	< 0.05	ns	ns	< 0.05
W83 x W83Δ0637 Normal 1µg	< 0.05	ns	< 0.05	< 0.05
W83 x W83Δ0637 Normal 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	ns
W83 x W83Δ0637 Normal 15µg	ns	ns	< 0.05	ns
W83 x W83Δ0637 Sem Hemina Exaurido	ns	ns	< 0.05	ns
W83 x W83Δ0637 Exaurido 1µg	< 0.05	< 0.05	ns	ns
W83 x W83Δ0637 Exaurido 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	ns
W83 x W83Δ0637 Exaurido 15µg	< 0.05	ns	< 0.05	< 0.05
W83 Normal Sem Hemina X 1µg	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83 Normal Sem Hemina X 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83 Normal Sem Hemina X 15µg	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
W83 Normal 1µg X 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	< 0.05
W83 Normal 1µg X 15µg	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
W83 Normal 5µg X 15µg	< 0.05	ns	< 0.05	ns
W83 Exaurido Sem Hemina X 1µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
W83 Exaurido Sem Hemina X 5µg	ns	ns	ns	ns
W83 Exaurido Sem Hemina X 15µg	ns	ns	ns	ns
W83 Exaurido 1µg X 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83 Exaurido 1µg X 15µg	< 0.05	ns	ns	ns
W83 Exaurido 5µg X 15µg	ns	< 0.05	< 0.05	ns
W83Δ0637 Normal Sem Hemina X 1µg	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83Δ0637 Normal Sem Hemina X 5µg	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
W83Δ0637 Normal Sem Hemina X 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83Δ0637 Normal 1µg X 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	ns
W83Δ0637 Normal 1µg X 15µg	ns	ns	< 0.05	ns
W83Δ0637 Normal 5µg X 15µg	ns	ns	< 0.05	ns
W83Δ0637 Exaurido Sem Hemina X 1µg	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83Δ0637 Exaurido Sem Hemina X 5µg	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
W83Δ0637 Exaurido Sem Hemina X 15µg	< 0.05	ns	< 0.05	ns
W83Δ0637 Exaurido 1µg X 5µg	< 0.05	ns	ns	ns
W83Δ0637 Exaurido 1µg X 15µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83Δ0637 Exaurido 5µg X 15µg	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83 Sem Hemina Normal X Exaurido	ns	ns	< 0.05	< 0.05
W83 1µg Normal X Exaurido	ns	ns	ns	< 0.05
W83 5µg Normal X Exaurido	ns	< 0.05	ns	ns
W83 15µg Normal X Exaurido	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
W83Δ0637 Sem Hemina Normal X Exaurido	ns	< 0.05	ns	< 0.05
W83Δ0637 1µg Normal X Exaurido	ns	< 0.05	ns	< 0.05
W83Δ0637 5µg Normal X Exaurido	ns	< 0.05	ns	< 0.05
W83Δ0637 15µg Normal X Exaurido	ns	ns	ns	ns

APÊNDICE D - Análise estatística Kruskal Wallis das comparações entre os monobiofilmes de *P. gingivalis* W83 e PgW83Δ1380, nas diferentes concentrações de hemina (sem hemina, 1 µg/ml, 5 µg/ml e 15 µg/ml), e nos diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). Significância valor $p < 0.05$.

Comparação	24h	48h	72h	96h
W83 x W83Δ1380 Normal Sem Hemina	ns	< 0.05	ns	ns
W83 x W83Δ1380 Normal 1µg	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
W83 x W83Δ1380 Normal 5µg	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83 x W83Δ1380 Normal 15µg	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
W83 x W83Δ1380 Sem Hemina Exaurido	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83 x W83Δ1380 Exaurido 1µg	ns	< 0.05	ns	< 0.05
W83 x W83Δ1380 Exaurido 5µg	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83 x W83Δ1380 Exaurido 15µg	< 0.05	< 0.05	ns	ns
W83 Normal Sem Hemina X 1µg	ns	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83 Normal Sem Hemina X 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
W83 Normal Sem Hemina X 15µg	< 0.05	< 0.05	ns	< 0.05
W83 Normal 1µg X 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	ns
W83 Normal 1µg X 15µg	< 0.05	ns	ns	ns
W83 Normal 5µg X 15µg	< 0.05	ns	< 0.05	ns
W83 Exaurido Sem Hemina X 1µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
W83 Exaurido Sem Hemina X 5µg	ns	ns	ns	ns
W83 Exaurido Sem Hemina X 15µg	ns	ns	ns	ns
W83 Exaurido 1µg X 5µg	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ns
W83 Exaurido 1µg X 15µg	< 0.05	ns	ns	ns
W83 Exaurido 5µg X 15µg	ns	ns	< 0.05	ns
W83Δ1380 Normal Sem Hemina X 1µg	ns	ns	ns	ns
W83Δ1380 Normal Sem Hemina X 5µg	ns	ns	< 0.05	< 0.05
W83Δ1380 Normal Sem Hemina X 15µg	< 0.05	ns	ns	< 0.05
W83Δ1380 Normal 1µg X 5µg	ns	ns	ns	ns
W83Δ1380 Normal 1µg X 15µg	< 0.05	< 0.05	ns	ns
W83Δ1380 Normal 5µg X 15µg	< 0.05	ns	< 0.05	ns
W83Δ1380 Exaurido Sem Hemina X 1µg	< 0.05	ns	< 0.05	ns
W83Δ1380 Exaurido Sem Hemina X 5µg	ns	ns	ns	ns
W83Δ1380 Exaurido Sem Hemina X 15µg	ns	ns	ns	< 0.05
W83Δ1380 Exaurido 1µg X 5µg	< 0.05	ns	< 0.05	< 0.05
W83Δ1380 Exaurido 1µg X 15µg	ns	ns	ns	< 0.05
W83Δ1380 Exaurido 5µg X 15µg	ns	ns	< 0.05	ns
W83 Sem Hemina Normal X Exaurido	ns	ns	< 0.05	< 0.05
W83 1µg Normal X Exaurido	ns	ns	ns	< 0.05
W83 5µg Normal X Exaurido	ns	< 0.05	ns	ns
W83 15µg Normal X Exaurido	< 0.05	< 0.05	ns	ns
W83Δ1380 Sem Hemina Normal X Exaurido	ns	ns	ns	ns
W83Δ1380 1µg Normal X Exaurido	< 0.05	ns	ns	ns
W83Δ1380 5µg Normal X Exaurido	ns	ns	< 0.05	ns
W83Δ1380 15µg Normal X Exaurido	< 0.05	< 0.05	< 0.05	ns

ANEXO – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

ESTUDO: “Expressão de genes de *Porphyromonas gingivalis* associados à aquisição de ferro em diferentes condições experimentais”

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 “Expressão de genes de *Porphyromonas gingivalis* associados à aquisição de ferro em diferentes condições experimentais”. 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 a relação entre os micróbios presentes na boca, principalmente aqueles que ficam na gengiva, e a causa de doenças infecciosas. Este conhecimento poderá trazer benefícios para a prevenção desta doença (periodontite);
- II) O material clínico (bactérias orais) será empregado neste trabalho científico para pesquisar a presença e associação de bactérias com a doença periodontal. A coleta das amostras será feita pelo cirurgião dentista, com instrumento esterilizado, em uma única coleta, de três sítios. Além disso, serão somente verificadas as condições clínicas bucais, com relação às doenças da gengiva;
- III) A remoção do material para estudo poderá causar desconforto, sangramento leve e dor. Entretanto estes sintomas são de curta duração e rápida recuperação, não ocasionando nenhum problema futuro;

- IV) Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o meu tratamento; não vão me curar e não vão me causar nenhum problema;
- V) A participação neste projeto não tem objetivo me submeter a um tratamento, bem como não me causará prejuízo financeiro com relação aos procedimentos clínicos ou terapêuticos realizados com o estudo;
- VI) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação ou justificativa;
- VII) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Também não irá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VIII) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- IX) Entendo que minha participação é voluntária e não serei recompensado financeiramente por ela.

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 2009

() 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