

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

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.

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 colagenases, 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 (Umamoto, 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 sanguínea através de atos simples, como mastigar ou falar, e principalmente durante a escovação, levando à bacteremia transitória. Esses periodontopatógenos presentes na corrente sanguínea são capazes de invadir células endoteliais, mediada 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-Ghiorghi 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-Ghiorghi 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 subgingival 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*.

2 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-Quiñones 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, Progulsk-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., Progulsk-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, Sörilin 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.