

GERUSA NEYLA ANDRADE SENHORINHO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Porphyromonas*
E *Fusobacterium* ISOLADAS DE CÃES COM E SEM PERIODONTITE E SUA
RELAÇÃO COM A RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

GERUSA NEYLA ANDRADE SENHORINHO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Porphyromonas*
E *Fusobacterium* ISOLADAS DE CÃES COM E SEM PERIODONTITE E SUA
RELAÇÃO COM A RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

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

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Senhorinho, Gerusa Neyla Andrade.

Análise microbiológica e molecular de espécies de *Porphyromonas* e *Fusobacterium* isoladas de cães com e sem periodontite e sua relação com a resposta imunológica / Gerusa Neyla Andrade Senhorinho. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Mario Júlio Ávila Campos.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bacteriologia dos anaeróbios.

Versão do título para o inglês: Microbiological and molecular analysis of *Porphyromonas* and *Fusobacterium* species isolated from dogs with and without periodontitis and their relationship with immunological response.

Descritores: 1. *Porphyromonas spp* 2. *Fusobacterium spp* 3. Bactérias anaeróbicas orais 4. Cães 5. Periodontite 6. Neutrófilos
I. Campos, Mario Júlio Ávila II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Microbiologia
III. Título.

ICB/SBIB019/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gerusa Neyla Andrade Senhorinho.

Título da Tese: Análise microbiológica e molecular de espécies de *Porphyromonas* e *Fusobacterium* isoladas de cães com e sem periodontite e sua relação com a resposta imunológica.

Orientador(a): Mario Júlio Ávila Campos.

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:

GERUSA NEYLA ANDRADE SENHORINHO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *Porphyromonas*
E *Fusobacterium* ISOLADAS DE CÃES COM E SEM PERIODONTITE E SUA
RELAÇÃO COM A RESPOSTA IMUNOLÓGICA**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

São Paulo
2010

A Deus, pela vida e saúde.

Aos meus queridos pais, Gizélia e João (in memoriam), por todo o amor e dedicação com que me educaram e por toda a confiança depositada em mim.

Ao meu amado marido, Nelson, pelo apoio incondicional e todo o amor, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Ao meu filho Nicholas, que me ensina diariamente a mais doce lição da vida: Ser mãe.

Aos meus irmãos, Joziane, Josélia e Evilásio, por todo o amor que existe entre nós.

Aos meus sogros, Eduardo e Ana Maria, e cunhadas, Domenica e Beatriz, por todo o apoio, carinho e amizade.

A todos os meus familiares, que sempre me apoiaram e participaram de cada conquista .

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos, por toda a dedicação, amizade, paciência e humildade, ensinando o verdadeiro significado da orientação.

À Profa. Ana Cristina de Azevedo Moreira, pelo incentivo durante a minha graduação, o que despertou o meu amor pela pesquisa em Microbiologia.

À amiga Viviane Nakano, pela amizade, carinho, incentivo e colaboração na parte experimental, que foram de grande importância na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Anaeróbios, Amanda do Nascimento e Silva, Alessandra da Mota Oliveira, Amelio Taveira, Ana Cláudia Okamoto, Elessandra Maria Silvestro, Luiz Fernando Tomazinho, Sheila Alexandra Bellini Nishiyama e Thays Wahasugui, por todo o aprendizado e auxílio durante todos esses anos.

À Zulmira Alves, pelo seu maravilhoso apoio técnico, alegria e carinho, que fizeram as dificuldades parecerem mais simples.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Gioso, do Laboratório de Odontologia Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pela agilidade e permissão das coletas em seu laboratório.

Aos Médicos Veterinários da Clínica Odontológica Veterinária ODONTOVET, Michele Venurini, Herbert Correa, Marco Antonio Leon, Alexandre Venceslau e Daniel Ferro, e às auxiliares Miriam Alves e Rosangela Silva, por toda a colaboração e ambiente amigável, que fizeram das minhas coletas uma tarefa possível.

Ao Dr. Sydney M. Finegold, do Laboratório de Anaeróbios da Faculdade de Medicina da UCLA, Los Angeles, CA, E.U.A., pela realização dos sequenciamentos genéticos para a confirmação das espécies bacterianas.

Ao laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade do Estado de Londrina (UEL), especialmente à Profa. Dra. Eiko Itano, à amiga Fernanda Nakanishi e à técnica Mari Kaminami, por todo o apoio nos experimentos envolvendo quimiotaxia de neutrófilos e pela forma carinhosa com que sempre me receberam.

Ao Prof. Dr. Carlos Taborda e ao colega Alexandre Marques, do Laboratório de Micologia do ICB da USP, pela colaboração nos experimentos que envolveram citocinas.

Ao Prof. Dr. Valdecir Marvulle, da Universidade Federal do ABC, e ao Prof. Dr. Gustavo Meléndez, da UFMG, pelas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez do Laboratório de Biologia de Tecidos Mineralizados, do ICB da USP, pela colaboração no experimento que envolveu microscopia.

A todos os meus professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos recebidos.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia Alice Shimabuku, Anamaria Amaral, Naide Farripas, e da Pós-Graduação Celso Pereira e Luciana da Silva, pelos préstimos e boa vontade com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB, pela eficiência e simpatia no trato conosco.

Aos funcionários do Setor de Esterilização do ICB, em especial Severina Cabral, José Gomes e Maria Elza Silva, por todo o apoio prestado.

Às minhas sempre amigas Daniele Vieira Lima, Deise Vilas Boas, Fernanda Almeida, Mara Martin, Sandra Vasco e Tamara Bernard, por todo o carinho, torcida e apoio nos momentos felizes e nos mais difíceis da execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo N° 04/09077-7), pelos auxílios financeiros.

Muito obrigado!

RESUMO

SENHORINHO, G. N. A. **Análise microbiológica e molecular de espécies de *Porphyromonas* e *Fusobacterium* isoladas de cães com e sem periodontite e sua relação com a resposta imunológica.** 100 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A periodontite é uma resposta inflamatória desencadeada por um complexo biofilme constituído por diversos microrganismos, particularmente por bactérias anaeróbias, tais como *Porphyromonas* spp. e *Fusobacterium* spp. Essas bactérias produzem vários fatores de virulência capazes de atuar no início e progressão da doença. Cem amostras subgingivais foram analisadas, sendo 50 de cães com periodontite e 50 de cães saudáveis, obtendo-se 144 isolados bacterianos identificados como pertencentes aos gêneros *Porphyromonas* e *Fusobacterium*. A produção de hemolisinas e hemaglutininas, susceptibilidade aos soros humano, canino e equino, e susceptibilidade a dez antibióticos foram avaliadas, assim como a presença dos genes *prtC* (colagenase), *fimA* (fimbrias), *tetQ* e *tetM* (resistência à tetraciclina). Igualmente, a capacidade quimiotática de neutrófilos e a produção de IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-11 e IL-17, foram avaliadas. β -hemólise foi produzida por *P. gulae*, *P. crevioricanis*, *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis* e *P. circumdentaria*. Dos 144 isolados, 21 *P. gulae* e 2 *F. nucleatum* aglutinaram eritrócitos humanos. A maioria dos isolados foi resistente à ação dos soros humano, equino ou canino. Todos os 144 isolados foram sensíveis à amoxicilina, clindamicina, tetraciclina, amoxicilina/clavulanato, cefoxitina e penicilina G. Três *P. gulae*, 2 *P. macacae* e 2 *P. canifelinum* abrigaram o gene *tetQ* e apenas um *F. nucleatum* e um *P. catoniae* foram positivos para a presença do gene *tetM*. As espécies *P. gulae*, *P. cangingivalis* e *P. circumdentaria* abrigaram o gene *prtC*. A maioria dos isolados abrigou o gene *fimA* tipo I e nenhum deles abrigou o gene *fimA* tipo V. Somente nas *P. gulae* foi observada a presença de cápsula pela microscopia eletrônica de transmissão. Todos os isolados estimularam quimiotaxia dos neutrófilos. Interleucinas IL-1 β , IL-8, TNF- α e IL-11 foram detectadas após estímulo com as espécies de *Porphyromonas*. As espécies de *Fusobacterium* não estimularam a produção de IL-11 e *P. gulae* induziu elevada concentração dessa citocina. Nenhum dos isolados estimulou a liberação de IL-17.

Palavras-chave: Periodontite; cães; bactérias anaeróbias orais; virulência; *Porphyromonas* spp.; *Fusobacterium* spp.

ABSTRACT

SENHORINHO, G. N. A. **Microbiological and molecular analysis of *Porphyromonas* and *Fusobacterium* species isolated from dogs with and without periodontitis and their relationship with immunological response.** 100 f. Ph.D thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Periodontitis is an inflammatory response caused by a complex microbial biofilm, including anaerobic bacteria such as *Porphyromonas* spp. and *Fusobacterium* spp. Those species present several virulence factors which act on early step and during the disease evolution. One hundred of subgingival samples were analyzed, obtained from 50 dogs with and 50 without periodontitis. One hundred and forty four bacterial species were isolated belonging to both *Porphyromonas* and *Fusobacterium* genus. Hemolysin and hemagglutinin production, susceptibility to human, equine and canine sera, and antimicrobial susceptibility to 10 antibiotics were evaluated. In addition, the presence of gene *prtC* (collagenase), *fimA* (fimbriae), *tetQ* and *tetM* (tetracycline resistance), as well as neutrophils chemotaxis and IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-11 and IL-17 production were also determined. β -hemolysis was produced by *P. gulae*, *P. crevioricanis*, *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis* and *P. circumdentaria*. Of the 144 isolates, 21 *P. gulae* and 2 *F. nucleatum* were able to agglutinate human erythrocytes. Most of the isolates were resistant to the action of human, equine or canine serum. All isolates were susceptible to amoxicillin, clindamycin, tetracycline, amoxicillin/clavulanate, cefoxitin and penicillin G. Three *P. gulae*, 2 *P. macacae* and 2 *P. canifelinum* harbored *tetQ*, and only one *F. nucleatum* and one *P. catoniae* were *tetM* positive. *P. gulae*, *P. cangingivalis* and *P. circumdentaria* harbored *prtC*. Most of the isolates harbored *fimA* I gene and none of them harbored *fimA* V. Only *P. gulae* showed capsule through transmission electron microscopy. All isolates induced neutrophils chemotaxis and IL-1 β , IL-8, TNF- α and IL-11 were produced when neutrophils were stimulated by *Porphyromonas* spp. *Fusobacterium* spp. did not stimulate IL-11 production and *P. gulae* induced high concentration of cytokine. None of the isolates stimulated IL-17.

Keywords: Periodontitis; dogs; oral anaerobic bacteria; virulence; *Porphyromonas* spp.; *Fusobacterium* spp.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Nomenclatura e sequência dos iniciadores utilizados na detecção de genes e suas respectivas temperaturas de anelamento	54
TABELA 2. Distribuição das espécies de <i>Porphyromonas</i> e <i>Fusobacterium</i> isoladas de 42 cães com periodontite e 23 sem periodontite	56
TABELA 3. Características fenotípicas das espécies de <i>Porphyromonas</i> isoladas de cães com e sem periodontite	57
TABELA 4. Porcentagem da atividade hemolítica e resistência aos diferentes soros das espécies de <i>Porphyromonas</i> e <i>Fusobacterium</i> isoladas.	58
TABELA 5. Títulos de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (IHA) das cepas hemaglutinantes dos eritrócitos humanos	59
TABELA 6. Suscetibilidade a 10 antimicrobianos de 98 bactérias isoladas de cães com periodontite	61
TABELA 7. Suscetibilidade a 10 antimicrobianos de 46 isolados bacterianos de cães sem periodontite.	63
TABELA 8. Determinação dos tipos fimbriais em espécies de <i>Porphyromonas</i>	66
TABELA 9. Índices de quimiotaxia de neutrófilos induzidos por 40 isolados bacterianos de origem canina	69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Detecção do gene <i>priC</i> em espécies de <i>Porphyromonas</i> isoladas.....	65
FIGURA 2. Detecção do gene <i>fimA</i> I em espécies de <i>Porphyromonas</i> isoladas.....	65
FIGURA 3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) por coloração negativa.....	68
FIGURA 4. Detecção dos genes <i>tetQ</i> e <i>tetM</i> nas espécies isoladas.....	68
FIGURA 5. Concentrações de citocinas induzidas pelas espécies estudadas.	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 MICROBIOTA BUCAL RESIDENTE	19
3.2 DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES	20
3.3 GÊNERO <i>Porphyromonas</i>	21
3.3.1 Aspectos Taxonômicos	21
3.3.2 Patogenicidade e Fatores de Virulência	24
3.3.2.1 Fímbrias	24
3.3.2.2 Colagenase	27
3.3.2.3 Hemaglutinação	29
3.3.2.4 Outros Fatores de Virulência.....	32
3.4 GÊNERO <i>Fusobacterium</i>	33
3.4.1 Aspectos Taxonômicos.....	33
3.4.2 Potenciais Fatores de Virulência.....	36
3.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	38
3.6 NEUTRÓFILOS NA DOENÇA PERIODONTAL	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 SELEÇÃO DOS CÃES.....	45
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS SUBGENGIVAIS.....	45
4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	45
4.4 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	46
4.5 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ALGUNS FATORES DE VIRULÊNCIA.....	46
4.5.1 Produção de Hemolisinas.....	46
4.5.2 Reação de Hemaglutinação.....	47
4.5.3 Reação de Inibição de Hemaglutinação.....	47
4.5.4 Suscetibilidade ao Soro.....	48
4.5.5 Determinação da Presença de Fímbrias.....	48
4.6 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIMICROBIANAS.....	49
4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	49
4.7.1 Detecção do Gene <i>prtC</i> Mediador da Produção de Colagenase	49
4.7.2 Tipificação de Genes Envolvidos na Produção de Fímbrias (<i>fimA</i>).....	50
4.7.3 Detecção dos Genes <i>tetQ</i> e <i>tetM</i> Mediadores da Resistência à Tetraciclina.....	51
4.8 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	51
4.8.1 Produção de Fatores Quimiotáticos.....	51
4.8.2 Separação de Neutrófilos.....	52
4.8.3 Ensaio de Quimiotaxia.....	52
4.8.4 Produção de Citocinas.....	53
4.8.5 Detecção de Citocinas.....	53
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
6 RESULTADOS	55
7 DISCUSSÃO	71
8 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que as superfícies do corpo humano e animal são colonizadas desde o nascimento por diversos microrganismos que formam a microbiota residente ou indígena. Esses organismos são benéficos ao hospedeiro e estão em número elevado, sendo, na sua maioria, formados por bactérias anaeróbias. A cavidade bucal abriga populações microbianas nos seus diversos ecossistemas, podendo ser isoladas das criptas tonsilares e linguais, sobre a superfície dos dentes e no sulco gengival (HENTGES, 1993).

A maioria das infecções por anaeróbios é comumente produzida pelos microrganismos da microbiota residente do hospedeiro. Dentre eles, podem ser destacadas as espécies dos gêneros *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Prevotella* (FINEGOLD, 1995). Esses processos infecciosos podem ser severos ou mesmo fatais, entretanto, essa severidade está relacionada a fatores imunológicos do hospedeiro (DUERDEN, 1994).

A microbiota bucal é diversa e está constituída, predominantemente, por bactérias anaeróbias Gram negativas, que possuem a capacidade de colonizar, invadir, produzir produtos tóxicos e gerar uma resposta imunológica agredindo os tecidos do hospedeiro (FENG; WEINBERG, 2006).

Dentre as diversas infecções bucais causadas por anaeróbios, pode-se destacar a doença periodontal. Essa doença é representada pela gengivite e periodontite (ALLAKER et al., 1997a). Esses processos infecciosos iniciam-se com a formação do biofilme dental, que gera uma resposta inflamatória, podendo resultar na perda dos ligamentos periodontais, perda óssea e eventual perda da unidade dental (SCHENKEIN, 2006). Em animais domésticos, particularmente cães, a doença periodontal é considerada a infecção mais comum, sendo estimado que aproximadamente 80% dos animais com idade acima de quatro anos apresentem algum grau dessa doença (HARDHAM et al., 2005b).

Em trabalho de revisão, HARVEY (1998) relatou que, na década de 30, já era reconhecida pela clínica veterinária a alta incidência da “doença dos dentes” em cães. Estudos realizados demonstram que a doença periodontal em pequenos animais está frequentemente relacionada com o aumento da idade, dieta mole e baixo peso corpóreo (WATSON, 1994; ALLAKER et al., 1997a).

Embora as periodontites em cães e humanos sejam clinicamente semelhantes, os microrganismos envolvidos nesses processos são diferentes, em termos bioquímicos e genéticos, o que vem gerando a classificação de novas espécies, particularmente em animais, sendo ainda pouco estudadas (CONRADS et al., 2004; FOURNIER et al., 2001).

Das bactérias anaeróbias presentes na bolsa periodontal humana, podem-se destacar as espécies *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, sabidamente de grande importância no início e na progressão das periodontites (MOORE; MOORE, 1994).

No biofilme subgengival, *F. nucleatum* é apontado por exercer um importante papel na adesão e coagregação dos colonizadores microbianos iniciais e tardios (BOLSTAD; JENSEN; BAKKEN, 1996; KAPATRAL et al., 2002). Por outro lado, é bem documentada na literatura internacional a participação de *P. gingivalis* nos processos periodontais humanos, sendo capaz de expressar um grande número de fatores de virulência envolvidos na patogênese dessa infecção (ANDRIAN; GRENIER; ROUABHIA, 2006). Dentre esses fatores, podemos mencionar a produção de fímbrias, cápsula polissacarídica, lipopolissacarídeo (LPS), hemaglutininas, colagenase e proteinases cisteínas (TRAVIS et al., 1997; GRENIER et al., 2003; HOULE et al., 2003).

Dentre os fatores de adesão encontrados em *Porphyromonas* spp., podem se destacar as fímbrias, as quais são componentes filamentosos localizados na superfície celular bacteriana, compostos por proteínas denominadas fimbrilinas, cuja produção é codificada pelo gene *fimA*. Em *P. gingivalis*; essas estruturas medeiam a adesão à superfície do dente, a coagregação bacteriana e a adesão e internalização às células epiteliais bucais. As fímbrias, por possuírem importantes propriedades imunomodulatórias, estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos e leucócitos polimorfonucleares (PMN) humanos, desempenhando um importante papel na patogênese da periodontite (GRAVES et al., 2005).

Outra importante estrutura, frequentemente observada em bactérias Gram-negativas é a cápsula. Essa é composta por polissacarídeos extracelulares hidrofílicos, carregados negativamente, que representam uma importante barreira físico-química, protegendo o microrganismo contra a perda de água, facilitando a coagregação bacteriana e protegendo-o contra o sistema imune do hospedeiro (MAYRAND; HOLT, 1988; ANDRIAN et al., 2006).

É sabido que o LPS de bactérias Gram-negativas constitui-se uma importante estrutura, capaz de estimular PMN a produzir IL-1 β , IL-8 e TNF- α , favorecendo, assim, a inflamação tecidual e a reabsorção óssea (YOSHIMURA et al., 1997). Estudos in vitro têm demonstrado que extratos de parede celular dessas bactérias inibem a atividade quimiotática de neutrófilos, o que poderia aumentar a severidade da doença periodontal (VAN DYKE et al., 1982).

Em *P. gingivalis*, a capacidade hemaglutinante tem sido associada ao processo de adesão às células do tecido gengival e à lise dos eritrócitos para a captura do íon ferro (DECARLO et al., 1999). A presença da enzima proteolítica colagenase, encontrada em *P.*

gingivalis, também parece desempenhar um importante papel na destruição e progressão da periodontite (WITTSTOCK et al., 2000). Essa enzima, ao lado de proteinases cisteínas parecem ser as responsáveis pela clivagem do colágeno tipo I, constituinte predominante nos tecidos periodontais (HOULE et al., 2003).

Diferente do que é observado no homem, *P. gingivalis* não é isolada com frequência em animais, tais como cães, e sim, outras espécies, entre elas *P. gulae*, *P. crevioricanis*, *P. gingivicanis*, *P. circumdentaria*, *P. canoris* e *P. macacae* (FOURNIER et al., 2001). *Fusobacterium nucleatum* constitui-se um importante anaeróbio da cavidade bucal e está envolvido no início e na progressão da periodontite, aumentando numericamente com o aumento da inflamação gengival e da destruição periodontal (KAPATRAL et al., 2002). Essa espécie, bem como *Fusobacterium canifelinum*, são encontradas comumente na microbiota bucal de cães (CONRADS et al., 2004).

Os cães são apontados como responsáveis por mais de 80% das infecções produzidas por anaeróbios devido às mordeduras, e isso representa aproximadamente 1% das visitas às emergências hospitalares (ALLAKER et al., 1997a). Estudos microbiológicos dessas infecções têm enfatizado a importância do conhecimento da microbiota bucal canina para o tratamento mais adequado das lesões por mordeduras (TALAN et al., 1999).

O aumento no cuidado com a saúde de animais domésticos, na prevenção e terapia de doenças infecciosas, tem colaborado com o aumento na frequência do uso de antibióticos, em especial o licenciado para uso humano. Segundo Guardabassi et al. (2004), o uso indiscriminado e sem critério de antibióticos no tratamento de infecções crônicas, em humanos e animais, constitui-se o principal responsável pelo aumento da resistência aos antimicrobianos em bactérias.

A crescente resistência aos antibióticos em anaeróbios, incluindo os periodontopatógenos, tem sido observada nas últimas décadas. Essa resistência pode representar um risco para o tratamento de casos severos da doença, onde o uso de antimicrobianos associados ao tratamento mecânico é requerido (EICK et al., 2004).

Sabendo-se da importância das espécies dos gêneros bacterianos aqui estudados no processo de doença periodontal em humanos, em termos clínicos e microbiológicos, este trabalho teve como objetivo conhecer melhor as características desses gêneros, pertencentes a microbiota periodontal canina, visando fornecer dados microbiológicos em termos de prevenção e tratamento desses processos em cães.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

1. Isolar e identificar espécies de *Porphyromonas* e *Fusobacterium* provenientes de amostras subgengivais de cães com e sem periodontite;
2. Avaliar alguns fatores de virulência das espécies isoladas, tais como: produção de hemolisinas e hemaglutininas; suscetibilidade aos soros canino, humano e equino, e presença de fimbrias;
3. Determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos das espécies isoladas;
4. Detectar genes mediadores da produção de colagenase (*prtC*), da produção de fimbrias (*fimA*) e da resistência à tetraciclina (*tetQ* e *tetM*);
5. Avaliar a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares ativados pelas espécies isoladas;
6. Quantificar a liberação de IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-11 e IL-17 por leucócitos polimorfonucleares estimulados pelas espécies isoladas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MICROBIOTA BUCAL RESIDENTE

É sabido que o homem e o animal, após o nascimento, iniciam a formação de uma microbiota estável denominada microbiota residente ou indígena (SORUM; SUNDE, 2001). A superfície corporal dos animais em condições normais, quase em sua totalidade, é colonizada por essa microbiota, que desempenha um importante papel na saúde animal, contribuindo para o desenvolvimento do sistema imune e oferecendo resistência à colonização por microrganismos alóctones ou exógenos (MARCOTTE; LAVOIE, 1998). Por outro lado, em determinadas situações, essa microbiota anfibiótica torna-se potencialmente patogênica aos tecidos hospedeiros (LILJEMARK; BLOOMQUIST, 1996; RUBY; BARBEAU, 2002).

Bactérias anaeróbias são sabidamente predominantes na microbiota bucal humana e animal (GOLDSTEIN; CITRON; FINEGOLD, 1984). A maioria das infecções por anaeróbios surge a partir da microbiota indígena do hospedeiro, sendo os gêneros *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Prevotella* considerados de maior importância clínica (FINEGOLD, 1995).

Rayan et al. (1991), analisando a microbiota bucal humana, canina e felina, observaram que bactérias anaeróbias foram mais comuns do que as aeróbias e o número microbiano na cavidade bucal de cães foi maior que em humanos.

Se por um lado muito é investigado a respeito da microbiota anaeróbia humana, poucos estudos ainda são realizados em relação à microbiota em animais (MIKKELSEN et al., 2008). Diferentes espécies periodontais foram identificadas em animais de pequeno porte, especialmente cães. Dentre elas, podem ser citadas: *P. cangingivalis* (COLLINS et al., 1994), *P. gingivicanis* (HIRASAWA; TAKADA, 1994), *P. crevioricanis* (HIRASAWA; TAKADA, 1994), *P. circumdentaria* (LOVE, 1992), *P. macacae* (Love, 1995); *P. gulae* (FOURNIER et al., 2001) e *F. canifelinum* (CONRADS et al., 2004). Segundo Elliot et al. (2005), os gêneros da microbiota bucal de cães são similares aos observados em humanos, embora diferenças significativas são notórias em nível de espécie. Segundo Syed, Svanberg e Svanberg, 1981, a predominância de *P. asaccharolytica* e *F. nucleatum* em periodontite agressiva, em cães da raça beagle, sugere que tais espécies exerçam importante papel no processo de doença nesses animais (SYED; SVANBERG; SVANBERG, 1981).

3.2 DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES

O processo infeccioso mais comum que afeta a maioria dos animais em idade adulta é a doença periodontal, incluindo-se gengivite, periodontite e abscesso periodontal (MIKKELSEN et al., 2008). Segundo Watson (1994), doença periodontal não é um problema recente em pequenos animais, tendo sido relatado, em 1923, por Gray, como uma doença que afetava esses animais, que progredia com a idade, causava perda de dentes, era mais comum em animais alimentados com dieta mole e podia resultar em doenças secundárias. Segundo Harvey (1998), a maioria de cães acima de cinco anos de idade sofrem de periodontite.

Gengivite é o termo que designa inflamação da gengiva, causada pelo acúmulo de biofilme dental. Representa uma parte essencial da patofisiologia da doença periodontal e pode ser detectada em cães que não recebam meticulosa e frequente higiene bucal. Por outro lado, é considerada reversível, uma vez que, removido o biofilme, a inflamação desaparece, sendo geralmente de pouca importância clínica, exceto como indicador de higiene bucal deficiente (HARVEY, 1998). Adicionalmente, gengivite representa um mecanismo de defesa que não necessariamente progride para periodontite (DUPONT, 1998).

Periodontite, por sua vez, é a resposta inflamatória desencadeada por uma complexa microbiota que, em um hospedeiro suscetível, resulta na perda de ligamentos periodontais, perda óssea e eventual perda da unidade dental (Loesche, 1993; Schenkein, 2006).

Está bem estabelecido que *P. gingivalis* é o patógeno periodontal primário em humanos; entretanto, estudos apontam que tal bactéria não é isolada em periodontite canina (FOURNIER et al., 2001; ELLIOT et al., 2005). Por outro lado, diferentes espécies de *Porphyromonas* e *Fusobacterium* foram detectadas por Elliot et al. (2005), demonstrando que espécies diferentes e específicas do periodonto animal poderiam ser responsáveis pela doença.

Hardham et al. (2005b), utilizando camundongo como modelo periodontal, observaram que *P. gulae* e *P. macacae* isoladas de cães com periodontite, foram capazes de induzir doença periodontal em animais infectados. Espécies como *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis*, *P. crevioricanis*, *P. circumdentaria*, *P. macacae*, *P. catoniae*, *P. gulae*, *F. nucleatum* e *F. canifelinum* são descritas na literatura como parte da microbiota periodontal de cães e gatos, podendo estar associadas à periodontite nesses animais, sendo que *P. macacae* e *P. gulae* seriam da maior relevância clínica na periodontite canina (ALLAKER et al., 1997a; ELLIOT et al., 2005; HARDHAM et al., 2005a).

A periodontite em cães, embora clinicamente semelhante à humana, parece ter uma progressão mais acelerada, apresentando consequências como anorexia e perda de peso, dor crônica, instabilidade da estrutura dental, quebra ou perda de dentes, fratura de mandíbula ou da maxila, e, quando não tratada, bactérias periodontais podem se disseminar para outros sítios do corpo, acarretando em doenças renais, coronárias e hepáticas (Hardham et al., 2005a).

Para Harvey (1998), a periodontite em cães pode ser considerada doença da civilização, uma vez que animais submetidos a fatores de domesticação, tais como aspectos químicos e mecânicos de diferentes dietas, estresse, maior tempo de vida e efeitos imunológicos de múltiplas vacinas, apresentam quadros periodontais mais severos do que animais selvagens.

3.3 GÊNERO *Porphyromonas*

3.3.1 Aspectos Taxonômicos

Embora o gênero *Porphyromonas* pareça ter sido observado anteriormente, em 1921, ocorreu a primeira descrição na literatura científica por Oliver e Wherry, que isolaram da garganta, amígdalas, ferimento cirúrgico abdominal infectado, urina e fezes humana, um bacilo anaeróbio, Gram negativo, produtor de pigmento negro, semelhante à melanina, o que os levaram a denominá-lo de *Bacterium melaninogenicum*.

Devido ao requerimento dos fatores X e V para seu crescimento, que era característico das espécies do gênero *Haemophilus*, em 1930, a 3ª edição do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey reclassificou *Bacterium melaninogenicum* como *Haemophilus melaninogenicum*. Prevót (1938), reagrupando várias espécies em novos gêneros e espécies, propôs que *H. melaninogenicum* fosse alterado para *Ristella melaninogenica* (PREVÓT, 1938 apud HOLDEMAN; JOHNSON, 1982). O nome, entretanto, não foi aceito e, Roy e Kelly (1939), na 5ª edição do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, reclassificaram as espécies no gênero *Bacteroides*.

Schwabacher, Lucas e Rimington (1947), ao estudarem o pigmento produzido por aquelas bactérias, determinaram que não se tratava de melanina e sim um derivado de hemina, propondo a alteração de *B. melaninogenicus* para *B. nigrescens*. Por outro lado, Kelly alertou que a alteração de espécies era contrária às regras internacionais de nomenclatura, concluindo que *Bacteroides melaninogenicus* deveria ter prioridade, sendo aceito e publicado na 7ª

edição do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey (1957). Até início da década de 70, bactéria anaeróbia, Gram negativa, que produzia pigmento negro sobre ágar-sangue, era identificada como *B. melaninogenicus*. Em 1974, na 8ª edição do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, Holdeman e Moore, baseados nas suas observações e nos resultados de Sawyer, MacDonald e Gibbons (1962) sobre características bioquímicas de *B. melaninogenicus*, classificaram três subespécies, baseados na capacidade de fermentar carboidatos: *melaninogenicus*, *intermedius* e *asaccharolyticus*.

Finegold e Barnes (1977) propuseram a reclassificação de *B. melaninogenicus* subespécie *asaccharolyticus* na espécie *Bacteroides asaccharolyticus*. Slots e Hausmann (1979), ao induzirem doença periodontal em *Macaca arctoides*, observaram 10 isolados de *B. melaninogenicus* que eram catalase positivos, um perfil que os diferiam das cepas até então conhecidas. No ano seguinte, Slots e Genco (1980) classificaram aqueles isolados em uma nova subespécie, *B. melaninogenicus* subespécie *macacae*.

Ainda em 1980, Coykendall, Kaczmarek e Slots, ao determinarem o conteúdo de bases (G + C) e homologia das sequências de base das cepas humanas e animais, observaram que as cepas de macaco diferenciavam-se das cepas humanas. Inicialmente, tais cepas foram classificadas como *B. asaccharolyticus* e *B. melaninogenicus* subespécie *macacae*, sendo sugeridas pelos autores duas novas espécies: *Bacteroides gingivalis*, para os isolados humanos, e *Bacteroides macacae*, para isolados de macaco.

Laliberté e Mayrand (1983) isolaram e caracterizaram *Porphyromonas* spp. de biofilme subgingival de cães e gatos, observando que todos eram catalase positivos, o que os distinguiam de *P. gingivalis* humano. Embora detectada essa diferença bioquímica, os autores não acreditaram tratar-se de espécies diferentes.

Love et al. (1987) descreveram uma nova espécie bucal pigmentada de gatos, *Bacteroides salivus*, que se diferenciava fenotípica e geneticamente dos isolados humanos descritos. Posteriormente, essa espécie foi detectada também em cães (HARDHAM et al., 2005a).

Shah e Collins (1988) observaram que as espécies *B. asaccharolyticus*, *B. gingivalis* e *B. endodontalis* faziam parte de um grupo homogêneo de espécies assacarolíticas que os diferenciava do grupo *B. fragilis*, sendo sugerida a reclassificação daquelas para o gênero *Porphyromonas*.

Na década de 90, estudos com bactérias pigmentadas isoladas de animais, especialmente cães, tornaram-se mais frequentes. Love et al. (1992) descreveram a presença de bactérias pigmentadas de negro, na cavidade bucal de gatos, que se diferenciavam das

demais descritas por serem catalase positivas e por não produzirem hemaglutinação ou atividade tipo tripsina. A nova espécie foi denominada *P. circumdentaria*. No mesmo estudo, os autores renomearam *Bacteroides salivosus* como *Porphyromonas salivosa*, baseados no estudo de Shah e Collins (1988).

Fournier e Mouton (1993), ao caracterizarem fenotipicamente espécies de *P. gingivalis* humana e animal, observaram heterogeneidade bioquímica entre os isolados, sendo sugerida a classificação dessa espécie em dois biótipos: humano e animal.

Em 1994, na 9ª edição do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, o gênero *Porphyromonas* foi enquadrado no grupo 6, como bastonetes Gram-negativos, retos, curvos ou helicoidais. Ainda em 1994, *P. gingivicanis*, *P. crevioricanis*, *P. cangingivalis*, *P. cansulci* e *P. canoris* foram descritas como específicas do periodonto canino (HIRASAWA; TAKADA, 1994; COLLINS et al., 1994; LOVE et al., 1994).

Love (1995), baseado na similaridade das sequências de RNAr de *P. salivosa* e *B. macacae*, propôs a reclassificação da última para *Porphyromonas macacae* comb. nov., como sinônimo sênior para *P. salivosa*.

Fournier et al. (2001) propuseram a classificação da espécie *P. gulae*, observada apenas em animais, sendo referida como a mais frequentemente isolada do sulco gengival de vários animais, capaz de ser diferenciada fenotípica e geneticamente de isolados humanos.

Conrads et al. (2005), ao determinarem a relação filogenética entre espécies do gênero *Porphyromonas*, utilizando sequências da região 16S RNAr, concluíram que *P. gulae* deveria ser tratada como espécie distinta de *P. gingivalis*.

Em Simpósio Internacional sobre Sistemática de Procariotos, várias autoridades no estudo de bactérias anaeróbias compilaram as características de alguns gêneros bacterianos (2008). Assim, Finegold reforçou as características que devem ser levadas em consideração no estudo de identificação das *Porphyromonas*, definidas como: bacilos ou cocobacilos Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios e não esporulados, produtores de pigmento negro sobre ágar sangue, proveniente de protohemina. Adicionalmente, foi ratificado que a posição taxonômica de espécies de *Porphyromonas* “não pigmentadas” necessita ser definida.

3.3.2 Patogenicidade e Fatores de Virulência

Segundo Sundqvist (1993), patogenicidade é um termo utilizado para descrever a habilidade de um microrganismo em produzir doença, sendo que o grau de patogenicidade do microrganismo define a virulência. Dentre os mecanismos pelos quais *Porphyromonas* spp. e outros anaeróbios são capazes de produzir doença, podem ser citados a capacidade de aderência e invasão, interferência na resposta imune do hospedeiro e danos teciduais (DUERDEN, 1994; LAMONT; JENKINSON, 1998).

Muitos estudos têm sido realizados sobre os efeitos patogênicos de espécies de *Porphyromonas* de origem humana, especialmente *P. gingivalis*, considerado patógeno periodontal primário. Vários são os fatores de virulência desse patógeno, podendo ser destacados: proteases extracelulares, como a proteinase cisteína; LPS e adesinas, assim como fímbrias e hemaglutininas, presença de cápsula e produção de colagenase, que atuam modulando a resposta imune do hospedeiro, degradando ou clivando proteínas celulares e receptores de superfície e interferindo na resposta inflamatória, iniciando ou exacerbando a doença periodontal (YALMAZ, 2008).

Por outro lado, embora doença periodontal seja comum em cães adultos e espécies do gênero *Porphyromonas* sejam frequentemente isoladas da cavidade bucal desses animais, pouco ainda é sabido em relação à etiologia da doença e, menos ainda, sobre a patogenicidade e virulência da sua microbiota periodontal (HARDHAM et al., 2005; MIKKELSEN et al., 2008).

As características patogênicas de espécies de *P. gingivalis* de origem humana são bem conhecidas; entretanto, em outras espécies similares do gênero *Porphyromonas*, particularmente de origem animal, ainda estão pouco esclarecidas, justificando-se, com isso, a análise desses fatores de virulência em animais de pequeno porte, como cães.

3.3.2.1 Fímbrias

Fímbrias são componentes filamentosos, localizados sobre a superfície bacteriana, que agem promovendo adesão e colonização bacteriana em sítios-alvo. *Porphyromonas gingivalis* possui dois tipos fimbriais, mediados pelos genes *fimA* e *mfa1*, que se diferenciam pelo peso molecular e respectiva antigenicidade (UMEMOTO; HAMADA, 2003; AMANO et al., 2004).

Yoshimura et al. (1984) detectaram fimbrias, pela primeira vez, em *P. gingivalis*, constituídas por uma proteína de forma filamentosa denominada fimbrilina. No mesmo estudo, foi demonstrado que essas proteínas purificadas não eram capazes de hemaglutinar ou inibir hemaglutinação.

Dickinson et al. (1988), analisando a sequência nucleotídica do gene *fimA* de *P. gingivalis*, concluíram que não existia homologia significativa com genes fimbriais de outras espécies de *Porphyromonas*, sugerindo que a fimbrilina era uma proteína de distribuição limitada.

Goulbourne e Ellen (1991) sugeriram o envolvimento das fimbrias de *P. gingivalis* na coagregação com bactérias Gram positivas, especialmente *A. viscosus*. No estudo, fimbrias de *P. gingivalis* ATCC 33277 foram isoladas e ensaios *in vitro* demonstraram haver coagregação entre essas estruturas e *Actinomyces viscosus*. Adicionalmente, fimbrias foram utilizadas no preparo de antisoro em coelhos, que mostrou ser capaz de inibir coagregação entre as duas espécies.

Collings e Love (1992) estudaram características físicas e bioquímicas em *P. salivarius* (*P. macacae*) e “*P. gingivalis*”, oriundas de gatos, bem como em cepas de *P. gingivalis*, *P. asaccharolytica* e *P. endodontalis* humanas. Foram observadas fimbrias finas, longas e onduladas em *P. macacae* e fimbrias curtas, menos abundantes e mais grossas nas demais “*P. gingivalis*” felinas e nas cepas humanas. O material capsular também se mostrou diferente nas cepas felinas, mais fino e fibrilar, assim como as atividades enzimáticas, especialmente quimiotripsina e α -galactosidade, positivas apenas nas cepas de *P. macacae*. Os autores sugeriram que a combinação dos três testes seria de grande importância na diferenciação de cepas de *P. macacae* das demais *Porphyromonas*, felinas e humanas.

Em 1994, quatro variantes do gene *fimA* foram caracterizados, com base nas sequências nucleotídicas: tipos I, II, III e IV (FUJIWARA et al., 1994; HAMADA et al., 1994). Ainda em 1994, Hamada et al. contruíram uma mutante de *P. gingivalis* ATCC 33277 para *fimA*. Essa cepa mostrou-se incapaz de produzir a proteína FimA de 41kDa e demonstrou reduzida capacidade de se aderir a fibroblastos gengivais e células epiteliais humanas cultivadas, sugerindo que o gene *fimA* seria determinante para a habilidade adesiva de *P. gingivalis*.

Hamada et al. (1996), utilizando microscopia eletrônica para estudar a cepa mutante contruída, pelos mesmos autores em 1994 (HAMADA et al., 1994), descreveram, pela primeira vez, a ocorrência de fimbrias curtas (67 kDa), que também estiveram presentes em cepas selvagens de *P. gingivalis* e diferenciaram-se das fimbrias longas (FimA) em tamanho e

antigenicidade. Os autores observaram a incapacidade das fimbrias curtas de aglutinar eritrócitos de coelho, não sendo sugerida a função dessas estruturas.

Xie, Cai e Lamont (1997) observaram que a expressão alterada de *fimA* de *P. gingivalis* poderia modular a habilidade do patógeno para aderir e invadir, e que a expressão desse gene poderia ser regulada em resposta às várias condições ambientais, tais como: alterações na temperatura, crescimento em meios líquido ou sólido, presença ou ausência de hemina e crescimento na presença de soro ou saliva. Em 2000, duas novas variantes do gene *fimA* foram caracterizados: V e Ib (NAKAGAWA et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2002).

Xie et al. (2000) realizaram um estudo para identificar as proteínas envolvidas na regulação do gene *fimA*, com o objetivo de entender o mecanismo de controle da transcrição fimbrial. Foi determinado que a própria fimbriolina, além da arginina (Rgp) e da lisina (Kgp) gingipaínas foram necessárias para a transcrição de FimA, sugerindo que *P. gingivalis* tenha evoluído múltiplos níveis de controle de expressão desse gene, podendo, com isso, aumentar a sobrevivência em ambientes hostis.

Ainda em 2000, Amano et al. determinaram que a maior prevalência de genótipos fimbriais era tipo I seguido do V, em isolados bucais de adultos saudáveis, e tipo II, seguido do tipo IV, em isolados oriundos de pacientes com periodontite.

Norris e Love (2001) estudaram a resposta de anticorpos contra fimbrias de *P. macacae* isolado de gatos, determinando que essas estruturas seriam similares às de origem humana e sugerindo que poderiam atuar de forma semelhante na doença periodontal desses animais.

Hamada et al. (2002), utilizando as fimbrias curtas da mutante de *P. gingivalis* ATCC 33277 (HAMADA et al., 1996), demonstraram a capacidade dessas estruturas de induzir a expressão de IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos. A quantidade de citocinas produzidas, tais como IL-1 α e IL-1 β foram comparadas à quantidade induzida por LPS de *Salmonella typhimurium*, sugerindo a capacidade dessas fimbrias curtas de estimular a alteração dos tecidos gengivais e perda óssea alveolar, típicas da periodontite.

Umemoto e Hamada (2003) avaliaram o papel das fimbrias longas e curtas de *P. gingivalis* na adesão e invasão de células epiteliais bucais, através da inativação dos genes que medeiam fimbrias longas e curtas (*fimaA* e *Mfa1*, respectivamente) nas cepas mutantes de *P. gingivalis* ATCC 33277 (MPG1, MPG67 e MPG4167). Os autores concluíram que ambos os tipos fimbriais seriam requeridos para esse patógeno aderir e invadir aquelas células.

Recentemente, Hamada et al.(2008) detectaram fimbrias em *P. gulae* (ATCC 51700) com peso molecular (41 KDa) e antigenicidade similares aos de *P. gingivalis*. No mesmo

estudo, foi sugerido que fímbrias de *P. gulae* poderiam apresentar variações clonais com alguma significância na função imunomoduladora do microrganismo. Adicionalmente, foi observado, *in vitro*, que determinadas cepas de *P. gulae* ligaram-se a células epiteliais bucais humanas, sugerindo que sítios de ligação com essas células estão presentes nesse isolado de origem animal.

Kuboniwa et al. (2009) estudaram o papel das fímbrias longas e curtas, bem como das proteinases arginina e lisina gingipainas de *P. gingivalis* na formação de biofilme homotípico *in vitro*. Foram utilizados mutantes da cepa *P. gingivalis* ATCC33277 com uma série de deleções dos genes *fimA*, *Mfa1*, *Rgp* e *Kgp*. Os biofilmes obtidos mostraram diferenças significativas entre as cepas selvagens e mutantes, sugerindo que as fímbrias longas atuam como mediadores positivos, estando envolvidas na adesão inicial e na organização do biofilme, enquanto as fímbrias curtas e lisina gingipaina seriam mediadores negativos, apresentando um papel regulatório supressor para os mesmos passos. Por outro lado, foi sugerido que a arginina gingipaina coordenaria a integridade do biofilme, bem como conteria o biovolume. Foi concluído que as moléculas estudadas agiriam coordenadamente no desenvolvimento do biofilme maduro.

3.3.2.2 Colagenase

Intensas investigações de *P. gingivalis* têm demonstrado suas inúmeras propriedades virulentas, dentre elas a grande atividade proteolítica, que pode representar importante fator para estágios invasivos iniciais da infecção ou da proteção contra a resposta imunológica do hospedeiro (KURAMITSU; YONEDA; MADDEN, 1995; LAWSON; MEYER, 1992).

Lucas e Thonard (1955) já observavam, em seus experimentos, que bactérias da bolsa periodontal eram capazes de desintegrar colágeno. Gibbons e MacDonald (1961) observaram que a enzima colagenolítica de *B. melaninogenicus*, diferente do que era visto em espécies de *Clostridium*, estava associada à célula bacteriana e que aquele microrganismo apresentava atividade colagenolítica.

Nas décadas de 60 e 70, estudos deram ênfase à colagenase tecidual e excluíram a colagenase bacteriana, como nos trabalhos desenvolvidos por FULLMER et al. (1969) e Golub et al. (1976). Em 1982, porém, Robertson et al. observaram que extratos de *B. gingivalis* (hoje *P. gingivalis*) e *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* (hoje *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) podiam causar extensiva degradação do colágeno, de forma diferente das colagenases teciduais. Enquanto as colagenases bacterianas apresentavam um

efeito de clivagem múltipla da molécula do colágeno, as collagenases teciduais clivavam o colágeno numa única ligação do peptídeo.

Kryshtalskyj, Sodek e Ferrier (1986) utilizaram dois cães da raça beagle, induzindo periodontite em dois quadrantes, gengivite em um terceiro e mantendo o quarto quadrante clinicamente sadio. Atividade collagenolítica foi determinada no fluido gengival, concluindo que os sítios com gengivite e periodontite apresentaram atividade collagenolítica significativamente maior do que em sítios sadios. Também foi observado que a atividade enzimática dos sítios com periodontite variou com o tempo, sugerindo um padrão cíclico. Foi concluído que a detecção de collagenases no fluido gengival poderia representar um critério clínico seguro para o monitoramento da doença periodontal.

Takahashi, Kato e Kuramitsu (1991) isolaram, pela primeira vez, o gene *prtC* em *P. gingivalis*, que foi capaz de expressar atividade collagenolítica. Em 1992, o mesmo grupo sequenciou e caracterizou esse gene, observando que o seu produto era capaz de hidrolisar o colágeno tipo I, solúvel e reconstituído, além de não apresentar nenhuma similaridade com collagenases de células eucarióticas. Nesse estudo, também foi sugerida a presença de uma segunda collagenase, o que, segundo os autores, poderia ser uma confirmação do estudo de Smalley, Birss e Shuttleworth (1988), de que enzimas do tipo tripsina também degradariam colágeno tipo I (KATO; TAKAHASHI; KURAMITSU, 1992).

Bodinka et al. (1994) detectaram a presença de *prtC* pela reação em cadeia da polimerase em 16 dos 22 *P. gingivalis* estudados, sugerindo que as cepas que apresentaram o gene poderiam ser mais virulentas. Estudos posteriores sugeriram que, embora a proteína PrtC fosse responsável por degradar colágeno, outras proteinases, como proteinases cisteínas, também estariam fortemente envolvidas nessa atividade (KURAMITSU; YONEDA; MADDEN, 1995).

A análise nucleotídica do gene *prtC* em isolados clínicos de *P. gingivalis* e a cepa referência ATCC 53977 demonstrou diferentes sequências, refletindo a heterogeneidade do gene *prtC*, sendo sugerido que poderia ser resultado de microevolução, onde os genes sofrem mais variações do que a estrutura genômica inteira (WITTSTOCK et al., 2000).

Houle et al. (2003) investigaram a atividade collagenolítica de *P. gingivalis*, utilizando cepas mutantes deficientes em gingipaínas, bem como gingipinas purificadas e inibidores seletivos de proteinases. Foi observado que, ao inativarem os genes *rgpA* e *rgpB*, que codificam as proteinases cisteínas arginina gingipaína A e B, respectivamente, a atividade collagenolítica sobre o colágeno tipo I foi totalmente inibida, sugerindo que essas enzimas seriam as responsáveis por tal capacidade. Essa conclusão foi confirmada pela inclusão de

leupeptina, um inibidor seletivo de arginina gingipaínas no ensaio fluorogênico, havendo inibição total de degradação do colágeno. Por outro lado, argininas gingipaínas purificadas foram incapazes de degradar colágeno, sendo sugerido que essa atividade requer que as enzimas estejam associadas à superfície bacteriana, ou que outra proteinase é requerida para agir junto com as argininas gingipaínas; ou, ainda, que argininas gingipaínas não degradam colágeno, mas estão associadas com o processamento de outras proteinases com atividade colagenolítica.

Yan-Min et al. (2007) determinaram a frequência de infecção por cepas de *P. gingivalis*, em pacientes com periodontite crônica e em sujeitos saudáveis, e avaliaram a correlação com parâmetros clínicos, que incluiu a detecção dos genes *prtC* e *fimA* em *P. gingivalis*. Foi observado que a presença de ambos os genes nos isolados esteve relacionada com a maior profundidade de bolsa periodontal e com maior perda de inserção, sugerindo que a presença de ambos os genes estaria fortemente associada à doença periodontal.

3.3.2.3 Hemaglutinação

A Hemaglutinação tem sido relacionada à habilidade da bactéria aderir-se aos tecidos do hospedeiro, passo inicial para a infecção bacteriana. O processo de hemaglutinação é definido como a agregação de eritrócitos causada pela adesão de moléculas bacterianas a dois ou mais eritrócitos (SLOTS; GENCO, 1979).

Okuda e Takazoe (1974) observaram que determinadas cepas de *B. melaninogenicus* possuíam atividade hemaglutinante, que parecia ser mediada por fímbrias. Por outro lado, Slots e Gibbons (1978), analisaram isolados assacarolíticos de *B. melaninogenicus* e acreditaram não haver relação entre aquelas estruturas e hemaglutinação, ao observarem que isolados fermentativos, que também possuíam fímbrias, não eram capazes de aglutinar eritrócitos humanos.

Slots e Genco (1979) utilizaram o teste de hemaglutinação direta para diferenciar *B. asaccharolyticus* (*P. asaccharolytica*) orais de não orais e sugeriram esse procedimento, como de potencial valor para fins de biotipagem.

Yoshimura et al.(1984) purificaram fímbrias de *P. gingivalis*, observando que essas estruturas apresentavam peso molecular (43 kDa) maior do que previamente reportado e não eram capazes de hemaglutinar ou inibir a hemaglutinação, sugerindo a presença de proteína tipo lectina ou outro tipo de fímbria como fatores hemaglutinantes naquele patógeno. Em

1987, Grenier e Mayrand demonstraram que moléculas responsáveis pela aderência a hemácias também estavam presentes nas vesículas extracelulares de *P. gingivalis*.

Ainda em 1987, Okuda e Kato estudaram a capacidade hemaglutinante de LPS de periodontopatógenos, observando que essa atividade variava entre eritrócitos de diferentes animais e não variava significativamente entre os diferentes tipos sanguíneos. Concluíram que LPS de *P. gingivalis* não apresentava capacidade de hemaglutinação.

Mouton et al. (1989) realizaram um estudo com o objetivo de identificar e caracterizar componente(s) da superfície de *P. gingivalis* responsáveis pela aderência a eritrócitos. Foi detectada, utilizando-se ensaios imunológicos, uma proteína não fimbrial na superfície de *P. gingivalis*, associada à capacidade de se ligar a eritrócitos, sendo denominada adesina hemaglutinante HA-Ag2 (MOUTON et al., 1989). Nesse mesmo ano, Progulske-Fox, Tumwasorn e Hold utilizaram *Escherichia coli* transformantes para determinar a expressão e função de hemaglutininas de *P. gingivalis*. Foi observado que três das *E. coli* foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho e estudos com imunoeletromicroscopia demonstraram que o produto do gene *hagA* clonado (hemaglutinina) localizava-se sobre a superfície celular de *P. gingivalis*.

Chandad e Mouton (1990) utilizaram a adesina HA-Ag2 detectada (Mouton, 1989) para a produção de antisoro policlonal, que reagiu com o extrato da superfície celular de *P. gingivalis* W83, gerando bandas de 33 e 38 kDa, detectadas por anticorpos monoclonais específicos para uma hemaglutinina de *P. gingivalis*. O antisoro foi utilizado para examinar a distribuição de HA-Ag2 entre cepas de *P. gingivalis* de origem humana e animal, sendo observada a presença das duas bandas em cepas humanas e apenas uma banda de 29 kDa nos extratos da superfície celular das cepas animais, concluindo que a adesina seria um antígeno comum às cepas humanas e animais de *P. gingivalis* e que suas subunidades apresentariam heterogeneidade em massa molecular.

Nishikata e Yoshimura (1991) purificaram uma hemaglutinina de *P. gingivalis* com capacidade de adesão à eritrócitos, hidrólise de proteínas e de substratos contendo arginina, sendo inibida por bloqueadores de tiol, concluindo-se que se tratava de uma proteinase cisteína. No ano seguinte, Hoover e Felton Jr. (1992) estudaram a relação entre hemaglutinação e proteinase tipo-tripsina, utilizando cepas mutantes de *P. gingivalis* deficientes em atividade dessa proteinase, que apresentaram capacidade de hemaglutinação significativamente reduzida. Adicionalmente, foram utilizadas cisteína e N-etilmaleimida, realçador e inibidor de atividade da proteinase, respectivamente, obtendo-se significativo aumento e inibição de hemaglutinação, específicas para *P. gingivalis*, uma vez que não houve

alteração da hemaglutinação de *F. nucleatum* testado. Foi sugerido que o sítio proteolítico da proteinase tipo-tripsina participava da hemaglutinação de *P. gingivalis*.

Chandad e Mouton (1995) analisaram a relação entre fimbrias e a adesina HA-Ag2 e sugeriram que esses dois componentes formariam um complexo, com atividade hemaglutinante, onde HA-Ag2 seria responsável pela interação receptor-ligante. Os autores sugeriram, também, que durante o processo de purificação das fimbrias, as adesinas seriam removidas, o que explicaria o fato de fimbrias não serem capazes de produzir hemaglutinação.

Ainda em 1995, Progulske-Fox et al. demonstraram a presença de um segundo gene para hemaglutinina, *hagB*, que exibiu nenhuma ou pouca homologia com *hagA*. O antisoro do gene clonado foi capaz de inibir a hemaglutinação por *P. gingivalis* 381, sugerindo o envolvimento desse gene na hemaglutinação desse microrganismo, além de sugerir a existência de outras hemaglutininas, também envolvidas nessa atividade.

Du et al. (1997), baseados no trabalho de Chandad e Mouton (1995), e utilizando anticorpos monoclonais antifimbrial e anti HA-Ag2, estudaram a distribuição de fimbrias e HA-Ag2 em cepas de *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Bacteroides* humanas e animais. Os resultados sugeriram a existência de vários tipos fimbriais ou, ainda, a presença de estrutura ou conformação fimbrial variável entre as espécies bacterianas. Também foi observada heterogeneidade em peso molecular da adesina HA-Ag2 entre as cepas *P. gingivalis* de cães e gatos em relação às humanas. Foi sugerido que, assim como fimbrias, HA-Ag2 seria uma estrutura antigênica peculiar a *P. gingivalis*, não sendo observada em espécies não hemaglutinantes.

Shi et al. (1999) demonstraram que as proteínas codificadas pelos genes *rgpA* (arginina gingipaina), *kgp* (lisina gingipaina) e *hagA* (hemaglutinina) eram de grande importância para a hemaglutinação de *P. gingivalis* e sugeriram que as fimbrias não seriam responsáveis pela capacidade de hemaglutinação desse patógeno. Yonezawa, Ishihara e Katsujikuda (2001) confirmaram a relação entre o produto do gene *rgpA* e a hemaglutinação por *P. gingivalis*. Nesse estudo, foi desenvolvida uma vacina para expressar a proteinase arginina gingipaina em camundongos, que foi demonstrada pela presença de anticorpos no soro dos animais imunizados, capazes de inibir as atividades de hemaglutinação de *P. gingivalis*. Foi sugerida que tal vacina poderia conferir imunidade contra infecção por *P. gingivalis*.

Shibata et al. (2005) desenvolveram anticorpos monoclonais humanos contra a hemaglutinina (130KDa) da cepa *P. gingivalis* 381, caracterizada em 1999 (SHIBATA et al., 1999). Os anticorpos demonstraram inibir a atividade de hemaglutinação dessa cepa, sendo

sugerido que a aplicação de um anticorpo específico poderia neutralizar a atividade de hemaglutinação de *P. gingivalis*, podendo ser usado no tratamento contra a periodontite.

3.3.2.4 Outros Fatores de Virulência

Estudos com espécies produtoras de pigmento negro demonstram uma variedade de fatores de virulência que vão além dos descritos anteriormente. Dentre eles, podem ser citados lipopolissacarídeo (LPS), cápsula, vesículas de membrana externa e proteinases cisteínas.

LPS é um importante componente das bactérias Gram-negativas que exibe poderosa capacidade imunoestimulatória e inflamatória (HASHIMOTO; ASAI; OGAWA, 2004). Esse componente bacteriano é capaz de ativar o sistema-complemento, quando incubado com soro, levando a geração de fatores quimiotáticos para neutrófilos (SNYDERMAN; GEWURZ; MERGENHAGEN, 1968), além de responsável por desencadear secreção de quimiocinas e citocinas, tais como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, contribuindo para a resposta inflamatória inicial (DIAS et al., 2007).

A cápsula é uma importante estrutura bacteriana, que serve como barreira físico-química para a célula, promove agregação bacteriana e proteção contra o sistema imune do hospedeiro, além de ser responsável pela soroespecificidade, podendo ser utilizada como importante ferramenta taxonômica (ADUSE-OPOKU et al., 2006). Seis sorotipos capsulares foram descritos em cepas de *P. gingivalis*: K1, K2 K3, K4, K5 e K6, representando diferentes estruturas capsulares e apresentando diferenças no potencial virulento (VAN WINKELHOFF et al., 1993; LAINE; APPELMELK; VAN WINKELHOFF, 1996; LAINE; VAN WINKELHOFF, 1998). Segundo d'Empaire, Baer e Gibson, 2006, polissacarídeos capsulares de *P. gingivalis*, sorotipo K1, foram capazes de estimular quimiotaxia de neutrófilos, além da produção de quimiocinas por macrófagos murinos, sugerindo que a resposta imune inata do hospedeiro contra esse sorotipo capsular pode desempenhar um importante papel na ativação celular inflamatória e recrutamento na doença periodontal.

Acredita-se que as vesículas de membrana externa desempenham importantes papéis na doença periodontal, servindo como reservatórios e, quando liberadas, como veículos para enzimas e toxinas, além de estarem envolvidas na aderência e agregação bacteriana (INAGAKI et al., 2006).

Proteinases cisteínas, especialmente arginina gingipaína e lisina gingipaína, têm sido estudadas em *P. gingivalis* e parecem contribuir para a patogênese da doença periodontal humana. Também se acredita estarem envolvidas na degradação de proteínas estruturais dos

tecidos periodontais, alteração da função dos neutrófilos, ativação e estimulação da expressão de hemaglutininas, degradação de LPS, processamento e translocação de moléculas de adesão e estimulação da inflamação por mediadores químicos (RANGARAJAN et al., 2008). Allaker et al. (1997b) estudaram a atividade de proteinases de *P. gingivalis* em isolados de cães e outros animais, observando que uma significativa proporção das proteinases totais eram arginina específicas e possuíam um moderado grau de homologia genética com o gene *rgpA* humano (precursor da proteinase arginina).

3.4 GÊNERO *Fusobacterium*

3.4.1 Aspectos Taxonômicos

Os primeiros dados sobre gênero *Fusobacterium* parecem ter surgido em 1893 no estudo de Rauchfus, analisando amostras de angina úlcero-membranosa, demonstrando a presença de bacilos fusiformes associados a espiroquetas (RAUCHFUS, 1893 apud WEAVER; TUNNICLIFF, 1905). Em 1894, Plaut descreveu bacilos fusiformes, a partir de casos de angina, denominando-os de “Bacillus de Miller” (PLAUT, 1894 apud LARSON; BARRON, 1913). Quatro anos depois, em 1898, Vincent descreveu com detalhes o bacilo fusiforme que estava associado com gangrena hospitalar e faringite, sendo denominado *Bacillus fusiformis* (VINCENT, 1898 apud HAMPP, 1945). Ainda em 1898, Veillon e Zuber, ao estudarem o papel de anaeróbios estritos na mucosa da cavidade bucal, isolaram um microrganismo aparentemente idêntico ao descrito por Vincent, o qual consideraram como *B. fusiformis* (VEILLON; ZUBER apud BENNETT; ELEY, 1993).

A maioria dos estudos publicados antes do isolamento de *Fusobacterium* spp. em cultura pura mostraram que bacilos fusiformes eram detectados em associação com espiroquetas, e que ambos estariam presentes em sítios doentes e saudáveis. Alguns autores acreditavam que os microrganismos observados eram distintos e estariam em simbiose, outros sugeriam tratar-se do mesmo microrganismo em formas diferentes (TUNNICLIFF, 1906; TUNNICLIFF, 1911).

Krumwiede e Pratt (1913) obtiveram êxito no isolamento de *B. fusiformis* e o classificaram em duas classes: fermentadoras e não fermentadoras de sacarose.

Em 1922, o gênero *Fusobacterium* foi proposto por Knorr, constituído por três espécies, segundo as características morfológicas: *F. polymorphum*, *F. nucleatum* e *F. plauti-vincenti*.

Varney (1927) isolou bacilos fusiformes de diferentes nichos da cavidade bucal e os classificou em tipos I, II, III e IV, sugerindo que os tipos III e IV poderiam ser facilmente distinguidos entre si por características morfológicas e que os outros dois deveriam ser submetidos a testes sorológicos. Spaulding e Retter (1937), baseados nos estudos de Varney (1927), dividiram o gênero *Fusobacterium* em dois grupos: *Fusobacterium* típico ou grupo I, com forma clássica fusiforme, e grupo II, com terminações arredondadas, assumindo formas bacilar ou espiralada.

Entre 1930 e 1970, os estudos dedicaram-se a criar sistemas de classificação para as três espécies já classificadas por Knorr. Werner, Neuhaus e Hussels (1971) estudaram os membros do gênero *Fusobacterium*, determinando que todos eram fracamente sacarolíticos, fazendo parte de uma única espécie, a qual chamaram de *F. fusiformis*. Ressaltaram que cepas descritas anteriormente como sacarolíticas seriam *Leptotrichia buccalis*. Esse estudo foi reconhecido em 1974 e as espécies *F. polymorphum* e *F. plauti-vincenti* foram, então, agrupadas como *F. nucleatum*, por Moore e Holdeman, como observado na 8ª edição do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey (1974).

Em 1984, dez espécies de *Fusobacterium* foram listadas na 1ª edição (vol. 1) do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, sendo elas: *F. nucleatum*, *F. gonidiaformans*, *F. varium*, *F. necrophorum*, *F. perfoetans*, *F. naviforme*, *F. russii*, *F. mortiferum*, *F. necrogenes*, *F. prausnitzii*.

Entre 1982 e 1985, cinco novas espécies de *Fusobacterium* foram propostas: *F. simiae*, isolada de biofilme dental de macacos; *F. periodonticum*, do periodonto humano; *F. alocis* e *F. sulci*, do sulco gengival humano e *F. ulcerans*, de úlceras tropicais (SLOTS; POTTS, 1982; SLOTS; POTTS; MASHIMO, 1983; CATO; MOORE; MOORE, 1985; ADRIAANS; SHAH, 1988).

Em 1990, a criação de subespécies de *F. nucleatum* foi sugerida. Dzink, Sheenan e Socransky (1990), baseados em padrões eletroforéticos e de homologia de DNA de *F. nucleatum* de humanos com e sem doença periodontal, sugeriram a classificação em três subespécies: *F. nucleatum* subespécie *nucleatum*, *F. nucleatum* subespécie *polymorphum* e *F. nucleatum* subespécie *vincentii*. Adicionalmente, Gharbia e Shah (1990) classificaram isolados de *F. nucleatum* humanos e animais, utilizando as técnicas anteriormente descritas, em quatro subespécies: *F. nucleatum* subespécie *nucleatum*, *F. nucleatum* subespécie *polymorphum*, *F. nucleatum* subespécie *fusiforme* e *F. nucleatum* subespécie *animalis*.

Gharbia e Shah (1992) realizaram um estudo comparativo entre *F. nucleatum* subespécie *fusiforme* e *F. nucleatum* subespécie *vincentii* (sugerida por Dzink, Sheenan e

Socransky, 1990), através de testes fisiológicos, bioquímicos e moleculares, concluindo que não poderiam ser diferenciadas, não descartando a possibilidade de se tratarem de subespécies distintas.

Morris, Andrews e Hogers (1997), estudando a diversidade genética da espécie *F. nucleatum*, determinaram três grupos genéticos distintos: I, II e III e sugeriram a necessidade de extensivos estudos bioquímicos, imunológicos e epidemiológicos para definir precisamente a sistemática do gênero *Fusobacterium*.

Javala e Eerola (1999), baseados nas sequências do 16S DNA ribossômico, reclassificaram *F. alocis* e *F. sulci* em outros dois gêneros distintos: *Filifactor alocis* e *Eubacterium sulci*, respectivamente. Conrads et al. (2002), analisando a relação filogenética entre espécies do gênero *Fusobacterium*, observaram heterogeneidade dentro desse gênero e sugeriram que *F. prausnitzii* fosse reclassificada.

Uma nova espécie isolada da cavidade oral de cavalos foi proposta, *Fusobacterium equinum*. (DORSCH; LOVET; BAILEY, 2001). Em 2004, foi descrito o *Fusobacterium canifelinum*, isolado da cavidade bucal de cães e gatos, bem como de lesões humanas após mordeduras por esses animais. Essa espécie foi diferenciada das demais pela resistência intrínseca à fluoroquinolona (CONRADS et al., 2004). Atualmente, cinco subespécies de *F. nucleatum* são reconhecidas: *polymorphum*, *nucleatum*, *vincentii*, *fusiforme* e *animalis* (KARPATY et al., 2007).

Em 2008, as características que devem ser levadas em consideração no estudo de identificação das espécies do gênero *Fusobacterium* foram resumidamente descritas por Gharbia, no Simpósio Internacional de Sistemática de Procariotos. As espécies até hoje definidas são: *F. canifelinum*, *F. equinum*, *F. gonidiaformans*, *F. mortiferum*, *F. naviforme*, *F. necrogenes*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum*, *F. perfoetens*, *F. periodonticum*, *F. russii*, *F. simiae*, *F. ulcerans* e *F. varium*.

3.4.2 Potenciais Fatores de Virulência

Fusobacterium nucleatum é um microrganismo anaeróbio Gram-negativo que, possivelmente, desempenha um importante papel na sucessão microbiana associada à doença periodontal (ZILM et al., 2007). Das espécies bacterianas detectadas na periodontite, *F. nucleatum* é a mais comum associada a infecções humanas e animais (BOLSTAD; JENEN; BAKKEN, 1996; MOORE; MOORE, 1994).

Esse microrganismo faz parte do chamado “complexo laranja”, junto com *Prevotella* spp. e *Peptostreptococcus* spp., espécies que estão presentes na periodontite em número elevado, mas cuja contribuição na doença permanece pouco conhecida (SOCRANSKI et al., 1998). Por outro lado, *F. nucleatum* apresenta potenciais fatores de virulência, dentre eles podem ser citados: capacidade de coagregação; produção de ácidos, especialmente ácido butírico; lise e aglutinação de eritrócitos; adesão e invasão a células epiteliais e aderência a leucócitos polimorfonucleares (KOLENBRANDER; ANDERSEN; MOORE, 1989; BOLSTAD; JENSEN; BAKKEN, 1996; GAETTI-JARDIM; AVILA-CAMPOS, 1999; HAN et al., 2000; MANGAN et al., 1989)

É sabido que a periodontite não está associada a uma determinada espécie bacteriana, mas, sim, com um grupo de bactérias que, para causar doença, devem ser capazes de colonizar a bolsa subgengival e produzir fatores agressores que diretamente causem danos aos tecidos do hospedeiro (SCHENKEIN, 2006). Altemeier (1941), em seu estudo com amostras de peritonite e apendicite, já observava que a presença de mais de uma espécie bacteriana estava associada ao maior grau da doença. Estudos em modelo animal têm mostrado que *F. nucleatum* aumenta sua virulência quando presente em infecções mistas (BROOK; WALKER, 1986).

Sabendo-se que *F. nucleatum* é uma das mais numerosas espécies observadas nas amostras gengivais de sítios doentes e saudáveis, Kolenbrander, Andersen e Moore (1989) determinaram que essa bactéria era capaz de coagregar com outros 12 gêneros bacterianos da cavidade bucal testados, incluindo *Porphyromonas*, e sugeriram que essa coagregação, bem como a comunicação metabólica entre elas, poderiam ser as responsáveis pela predominância numérica de *F. nucleatum* em diferentes condições.

Bradshaw et al. (1998) estudaram o papel de *F. nucleatum* em comunidades microbianas bucais, concluindo que a coagregação dessa bactéria com outras espécies permitiu a sobrevivência de anaeróbios estritos, como *P. gingivalis*, em culturas expostas ao ar. Adicionalmente, Diaz, Zilm e Rogers (2002) sugeriram que *F. nucleatum* teria um papel

indireto na etiologia da doença periodontal, suportando o crescimento de *P. gingivalis* e outros anaeróbios bucais em ambientes oxigenados.

Estudos mostraram que a presença de compostos metabólicos poderia participar da agressão aos tecidos do hospedeiro. Assim, Singer e Buckner (1981) relataram que ácido butírico e propiônico, liberados no biofilme dental por *F. nucleatum*, poderiam ser capazes de desempenhar importantes funções na iniciação e progressão da doença periodontal. Adicionalmente, Pöllänen e Salonen (2000), estudando o efeito do butirato sobre células epiteliais gengivais, concluíram que esse ácido era capaz de romper a adesão celular, contribuindo para a destruição tecidual na doença periodontal.

Isolados de *F. nucleatum* mostraram ser capazes de aglutinar e lisar eritrócitos de origem humana e animal, sendo sugerido que essas habilidades poderiam desempenhar importantes papéis na patogênese da doença periodontal (FALKLER; HAWLEY, 1977; FALKLER; CLAYMAN; SHAEFER, 1983; GAETTI-JARDIM; AVILA-CAMPOS, 1999).

Falkler e Hawley (1977) já observavam a capacidade da espécie *F. nucleatum* e a incapacidade de outras espécies, como *F. mortiferum*, *F. necrophorum* e *F. varium* de aglutinarem eritrócitos humanos e animais. A atividade foi observada com células bacterianas inteiras e, na maioria dos testes, com sonicados. Adicionalmente, foi observada a atividade de hemaglutinação em preparados da parede celular bacteriana, que pareceu ser dependente de um componente protéico da parede celular. Nesse estudo, não foram detectadas fímbrias em *F. nucleatum*. Foi sugerido que a habilidade de aglutinar dessa espécie seria uma importante ferramenta para o estudo dos mecanismos de adesão em doença periodontal. De acordo com os dados do estudo anterior, Dehazya e Coles (1982) sugeriram que a atividade de hemaglutinação de *F. nucleatum* não estaria envolvida com fímbrias, mas que a hemaglutinina seria uma proteína ou dependeria de um componente proteico. Adicionalmente, os autores observaram que açúcares não eram capazes de inibir a hemaglutinação de *F. nucleatum*, diferente do que era visto em outras espécies bacterianas.

Falkler, Clayman e Shaefer (1983) relataram que estruturas de *F. nucleatum*, tais como parede celular e extratos de LPS, produziram atividade hemolítica. Em estudo realizado por Gaetti-Jardim e Avila-Campos (1999), cepas de *F. nucleatum* de origem humana e animal foram capazes de produzir hemaglutinação, sendo que a maioria lisou eritrócitos total ou parcialmente. Em ambos os estudos, a hemaglutinação produzida por *F. nucleatum* não variou com a utilização de diferentes tipos sanguíneos humanos.

Outra importante característica de *F. nucleatum* é a capacidade de aderir e invadir células epiteliais. A adesão a células epiteliais é um importante fator para a colonização

bacteriana, enquanto invasão permite a evasão bacteriana ao sistema imune do hospedeiro, bem como a sua disseminação nos tecidos (HAN et al., 2000). Em 1971, Gibbons e Houte já observavam a capacidade de *F. nucleatum* para aderir significativamente a células epiteliais bucais, sugerindo que essa capacidade poderia estar relacionada com a virulência bacteriana.

Han et al. (2000) observaram a alta capacidade invasiva de *F. nucleatum* a células epiteliais bucais, através de um importante mecanismo de invasão com formação de vacúolos, geralmente realizado por *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. Nesse estudo, foi sugerido que lectina ligada à galactose estaria relacionada com a adesão bacteriana à célula. Okamoto et al. (2002) detectaram adesão a células epiteliais bucais por *F. nucleatum*, e sugeriram que adesinas localizadas na parede celular ou na membrana externa estariam participando do mecanismo adesivo. Nesse estudo, não foi detectada a presença de cápsula.

Mangan et al. (1989) estudaram a interação entre *F. nucleatum* e neutrófilos humanos, observando que essa bactéria era capaz de se ligar fortemente ao neutrófilo, mesmo na ausência de opsoninas do soro, tais como anticorpos e complemento, através de uma proteína tipo lectina. Também foram determinadas a ativação dos neutrófilos e a produção de anión superóxido e liberação de lisozima, que causam danos teciduais, sugerindo a importante participação de *F. nucleatum* na doença periodontal.

Candela et al. (2009), em estudo inédito, detectaram a presença de poli- γ -glutamato em sobrenadante de cultura de *F. nucleatum*, um polímero que, quando associado à membrana em bactérias Gram-positivas é uma cápsula, como tal conferindo virulência às patogênicas, ou vantagem seletiva para bactérias não-patogênicas crescerem em ambientes hostis. Foi sugerido que a presença de tal polímero pode desempenhar um importante papel na interação de *F. nucleatum* com outras bactérias na formação do biofilme, ou pode, ainda, ser um componente da matriz extracelular, podendo facilitar a invasão de células do hospedeiro por *P. gingivalis*.

3.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência a antimicrobianos em bactérias é um problema complexo para a clínica médica e veterinária. Isso é devido às diferentes espécies bacterianas, mecanismo de resistência e de transferência de elementos genéticos (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004). A resistência a antibióticos entre os anaeróbios tem aumentado desde a década de 70. Anaeróbios que eram considerados altamente sensíveis a determinados

antibióticos, tais como: clindamicina e beta-lactâmicos, têm desenvolvido resistência aos mesmos, gerando interesse na determinação da apropriada terapia antibiótica (HECHT, 2004).

A elevada resistência bacteriana aos antimicrobianos, observada no tratamento de infecções, tem despertado a preocupação com o uso dessas drogas em animais. O efeito do uso de antimicrobianos em animais domésticos, bem como nos seus proprietários, não tem sido significativamente explorado (PRESCOTT et al., 2002). Pequenos animais, como cães e gatos representam uma fonte potencial de disseminação de resistência a antimicrobianos, devido ao uso extensivo desses agentes e ao contato próximo com o humano (KRUSE, 1999; WEGENER et al., 1999).

Classes antimicrobianas frequentemente utilizadas em pequenos animais na medicina veterinária incluem, penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, lincosamidas, ácido fusídico, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Infecções bucais envolvendo gengivite e periodontite, especialmente em cães e gatos, são geralmente tratadas por métodos mecânicos e por uso de drogas, tais como: amoxicilina, penicilina G, amoxicilina com ácido clavulânico, espiramicina, clindamicina ou metronidazol (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004).

Reed (1988), em revisão sobre o uso experimental de agentes antimicrobianos no tratamento de gengivite e periodontite em cães, concluiu que o uso desses agentes seria benéfico para o controle e tratamento de periodontite, uma vez que esses agentes suprimiam ou eliminavam bactérias patogênicas, mecanismos adesivos bacterianos e atividade da enzima collagenase.

Bader e Goldhaber (1966) já observavam a presença de tetraciclina no fluido do sulco gengival canino, após a sua administração intravenosa. Dean et al. (1969) trataram cães com gengivite administrando metronidazol e concluíram que rapidamente o desconforto e a presença de mau hálito desapareceram. Adicionalmente, Listgarten, Lindhe e Parodi (1979) compararam a terapia clínica com metronidazol e tetraciclina em cães com gengivite, concluindo que ambos os antibióticos eram capazes de modificar a microbiota bucal dos animais, reduzindo espiroquetas e células cocóides. Posteriormente, em 1982, Dolen et al., em estudo de gengivite experimental em cães, administraram metronidazol ou clindamicina, concluindo que metronidazol era o antibiótico mais efetivo, embora a clindamicina tenha suprimido em 50% o crescimento bacteriano, no final do período de quatro semanas.

É bem estabelecido que o procedimento profilático de higiene bucal, bem como o tratamento periodontal mecânico são efetivos na prevenção e tratamento de periodontite em cães. Por outro lado, a ausência de higiene bucal nesses animais, muitas vezes por falta de

informações dos seus proprietários ou mesmo pela falta de motivação em realizá-la, faz com que o uso de antibióticos seja a primeira alternativa entre veterinários para o tratamento de periodontite em cães (REED, 1988; RADICE; MARTINO; REITER, 2006).

Embora o uso de antibióticos em cães não seja algo moderno, o aumento da atenção a esses animais, bem como a procura por cuidados veterinários, prevenção e terapia de infecções têm aumentado substancialmente. Como consequência disso, pode-se observar o aumento do uso de agentes antimicrobianos naqueles animais, incluindo antibióticos e compostos de importância primária no tratamento de infecções humanas, aumentando a prevalência de resistências em diferentes espécies bacterianas (GUARDABASSI; SCHWARZ; LLOYD, 2004).

Harvey et al. (1995) avaliaram a suscetibilidade de *Porphyromonas* spp. e *Fusobacterium* spp. de cães à amoxicilina/clavulanato, cefadroxil e clindamicina, observando 100% de sensibilidade. O mesmo ocorreu com *P. gingivalis*, *P. macacae* e *P. circumdentaria* isolados de gatos, quando testados para amoxicilina, amoxicilina/clavulanato, benzilpenicilina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina e metronidazol (NORRIS; LOVE, 2006). Por outro lado, em 2006, Radice, Martino e Reiter, observaram a resistência de *P. gingivalis*, isolados de cães, à amoxicilina/clavulanato, eritromicina e metronidazol.

Um agente antimicrobiano de amplo espectro, frequentemente utilizado na terapia periodontal humana e no tratamento de infecções dermatológicas em animais, é a tetraciclina (OKAMOTO; TAKANO; MAEDA, 2001; OLIVEIRA et al., 2008). O aumento da resistência a essa droga, entretanto, tem sido observado, assim como a presença de genes *tet*, que medeiam a sua resistência (SCHWARZ; WANG, 1993; MANCH-CITRON et al., 2000; CHOPRA; ROBERTS, 2001).

A resistência à tetraciclina pode ocorrer através do mecanismo de efluxo bacteriano, proteínas de proteção ribossomal ou por inativação enzimática da tetraciclina. As proteínas de proteção ribossomal protegem o ribossomo da tetraciclina, doxiciclina e minociclina, dentre elas podendo ser citadas TetQ e TetM, codificadas pelos genes *tetQ* e *tetM*, respectivamente, e que são frequentemente associados a transposons conjugativos (TAYLOR; CHAU, 1996; CHOPRA; ROBERTS, 2001).

Scwarz e Wang (1993) detectaram resistência à tetraciclina e à minociclina em isolados de *Staphylococcus intermedius* isolados de infecções de pele de cães, que abrigaram o gene *tetM*. Arseze, Tomasetig e Botta (2000), analisaram a propagação de fatores de resistência a antibióticos em anaeróbios humanos, entre eles *Porphyromonas* spp. e *Fusobacterium* spp., observando a presença do gene *tetQ* somente em um isolado de

Porphyromonas levii, sugerindo a baixa incidência de transferência horizontal do gene por elementos conjugativos entre esses dois gêneros. Dados da literatura apontam que espécies de *Porphyromonas* estão mais frequentemente associadas ao gene *tetQ*, enquanto espécies de *Fusobacterium* seriam associadas ao gene *tetM*, sendo que ambos os genes podem estar presentes nesses gêneros (MANCH-CITRON et al., 2000; CHOPRA; ROBERTS, 2001).

3.6 NEUTRÓFILOS NA DOENÇA PERIODONTAL

Os neutrófilos, além de monócitos e outros granulócitos formam a arma mielóide do sistema imune. Metade dos leucócitos infiltrados no epitélio juncional e 90% deles no fluido gengival são neutrófilos (MIYASAKI, 1991). Esses tendem a se acumular na interface biofilme-tecido e abaixo da junção epitelial, funcionando como o primeiro mecanismo celular de defesa do hospedeiro contra os agentes produtores do processo periodontal (VAN DIKE, 1984; BRAINBRIDGE; DARVEAU, 2001).

A principal função dos neutrófilos é liberar substâncias antimicrobianas para destruir microrganismos-alvo, podendo utilizar quatro diferentes mecanismos: 1) explosão respiratória, atividade que requer a presença de dioxigênio e há liberação de ânion superóxido e água oxigenada; 2) secreção extracelular de grânulos azurófilos; 3) fagocitose, onde o microrganismo é isolado e sofre a ação de antimicrobianos lisossomais, e 4) morte celular, com liberação de substâncias lisossomais, citoplasmáticas e nucleares (MIYASAKI, 1991).

A migração de neutrófilos para os sítios periodontais específicos é um fenômeno denominado quimiotaxia, que acontece como resposta aos mediadores solúveis, ou quimiotáticos, que se ligam aos receptores de membrana dos neutrófilos e ativam uma série de eventos físicos e bioquímicos. Esses fatores quimiotáticos podem ser representados pela síntese de produtos bacterianos direta ou pelas interações bacterianas com soro e/ou tecidos (KLEMPNER, 1984).

Segundo Brainbridge e Darveau (2001), embora LPS bacteriano seja altamente conservado, diferenças estruturais importantes podem ser observadas entre as diferentes espécies que podem, significativamente, alterar a resposta do hospedeiro. Em 1968, Snyderman, Gewurz e Mergent demonstraram a capacidade do LPS bacteriano, na presença de soro fresco, produzir fator quimiotático para neutrófilos, através da ativação do sistema-complemento. O fator quimiotático era um produto que apresentou baixo peso molecular (15-30 kDa) e diferiu dos outros derivados do sistema-complemento, C'5, C'6 e C'7 (WARD et

al., 1965), sendo sugerido que esse sistema, induzido por endotoxinas, mediará certos aspectos da inflamação, através da liberação desses produtos.

Também em 1968, Ward, Lepow e Newman, ao estudarem fatores bacterianos quimiotáticos para neutrófilos, não detectaram tal capacidade em células estimuladas por bactérias Gram-negativas. Por outro lado, observaram a produção de fatores quimiotáticos por bactérias Gram-positivas, capazes de ativar neutrófilos mesmo na ausência de soro, sugerindo que esse mecanismo poderia possibilitar ao hospedeiro lidar com microrganismos invasores, sem depender de proteínas do soro para a mobilização de neutrófilos.

Sveen (1977) avaliou a capacidade quimiotática de neutrófilos induzidos por bactérias Gram-negativas, previamente incubadas com soro, concluindo que LPS de *F. nucleatum* e *P. melaninogenica* foram quimiotáticos, mas ativaram menos a quimiotaxia quando comparados com LPS de *Salmonella enteritidis*. Também foi observado que, quando LPS não foi incubado com soro, não foi capaz de induzir quimiotaxia, sugerindo que tal estrutura não apresenta atividade direta sobre neutrófilos.

Sundqvist e Johansson (1980) observaram que bactérias Gram-negativas, tais como *F. nucleatum*, *P. melaninogenica* e *P. asaccharolytica*, isoladas de polpa dental necrosada, eram altamente capazes de estimular quimiotaxia de neutrófilos. Não foi observada diferença na indução quimiotática entre as espécies, sugerindo que esses organismos não teriam habilidade em gerar fatores quimiotáticos.

Maeda et al. (1988) determinaram a capacidade da cepa *P. gingivalis* 381 em modular a função de neutrófilos, suprimindo a ligação de formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), um peptídeo quimiotático derivado de parede bacteriana com grande potencial de estimular neutrófilos, além de reduzirem a produção de ânion superóxido por polimorfonucleares, quando incubados com o sobrenadante bacteriano. Foi sugerido que aquele patógeno liberava substâncias capazes de interferir na atividade de neutrófilos, alterando o processo inflamatório nos sítios infectados. Fotos et al. (1992), estudando a migração de neutrófilos e monócitos, concluíram que sonicados de *P. gingivalis* foram capazes de inibir a quimiotaxia sem, entretanto, causar citotoxicidade a essas células, como demonstrado pela técnica de azul de trypan, sendo sugerido que tenha havido alguma inibição funcional por produtos bacterianos solúveis antes que as células perdessem a viabilidade. Foram sugeridas três teorias para explicar essa alteração funcional dos neutrófilos e monócitos: 1) algum sítio do receptor de membrana poderia apresentar uma ligação irreversível com alguma parte do sonicado; 2) a ligação de algum componente do sonicado à membrana estabilizaria essa estrutura a agentes

quimiotáticos; 3) o sonicado poderia interferir em processos metabólicos específicos ou elementos citoesqueléticos.

Rubinstein et al. (2001), em estudo com a proteína cisteína gingipaína de *P. gingivalis*, observaram que a proteína foi capaz de induzir inflamação na mucosa oral de hamsters, pela produção de exudato plasmático e bradicinina. Graves et al. (2005), avaliando a capacidade de fímbrias de *P. gingivalis*, concluíram que tais estruturas eram proinflamatórias mas não eram o principal fator estimulatório para a resposta imune inata. Foi sugerido que outros fatores, como LPS ou gingipaínas, poderiam ser os responsáveis pela estimulação inicial do sistema imune.

Os neutrófilos são capazes de expressar uma variedade de proteínas envolvidas na inflamação e na resposta imunológica, entre elas citocinas tais como IL-1 β , IL-1ra (interleucina receptor antagonista), IL-8, IL-12, TNF- α , TGF- β , MIP-1 α , MIP-1 β , GM-CSF e IFN- α (CASSATELA, 1995; SCAPINI et al., 2000).

Citocinas desempenham importantes papéis em diferentes processos fisiológicos, embora induzam patologias quando expressadas inapropriadamente. Estas proteínas possuem a capacidade de causar a morte celular, por isso suas atividades são cuidadosamente reguladas por reguladores negativos, que incluem citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e IL-11 e por inibidores, como IL-1 receptor antagonista, que agem como bloqueadores competitivos. Por outro lado, em condições patológicas, como na periodontite, observa-se um resultado de atividade proinflamatória (GRAVES; COCHRAN, 2003).

Interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) são citocinas proinflamatórias e pluripotentes que desempenham importante papel na doença inflamatória. Estas proteínas são especialmente produzidas por monócitos/macrófagos e neutrófilos, apresentando efeitos pleiotrópicos, incluindo ativação de leucócitos inflamatórios, modificação da permeabilidade vascular, e indução de reabsorção óssea (YOSHIMURA, 1997; GALBRAITH ET al., 1997).

Interleucina 8 (IL-8) descrita em 1987, por Baggiolini, Walz e Kunkel, como uma proteína ativadora de neutrófilos, liberada por fagócitos e por uma variedade de células teciduais quando expostos ao estímulo inflamatório, e capaz de induzir quimiotaxia e liberação de grânulos enzimáticos. Esta citocina exerce importante papel na inflamação e defesa do hospedeiro, e tem sido detectado em infecções, isquemia, trauma e outros distúrbios da homeostasia, especialmente quando os níveis de IL1 e TNF estão elevados.

Interleucina 17 desempenham papel protetor e patogênico para o sistema imune. Se por um lado, é importante contra agentes infecciosos, por outro é observada em altos níveis

em doenças auto-imunes (JEFFREY et al., 2007). Estudos mostram que IL-17 na doença periodontal é produzida em níveis elevados, podendo desempenhar, junto a outras citocinas, importante papel na imunopatogênese da doença (TAKAHASHI ET al., 2005; VERNAL ET al., 2005). Por outro lado, dados contraditórios são também observados na literatura mostrando níveis baixos da mesma em bolsa periodontal podendo contribuir na homeostasia óssea (JEFFREY et al., 2007; AVANI ET al., 2009).

Interleucina 11 é considerada uma citocina tipo IL-6, descrita em 1990 (PAUL et al., 1990), sendo observada em células estromais, incluindo fibroblastos, células epiteliais, condrócitos, sionoviócitos e osteoblastos, e esta citocina produz vários efeitos biológicos que incluem hematopoiese, reposta imune e metabolismos ósseo e nervoso (DU; WILLIAMS, 1997). Esta citocina parece ter um papel regulatório sobre a resposta do hospedeiro na doença periodontal, graças às propriedades anti-inflamatórias, sendo capaz de inibir a produção de TNF α , IL-1 β e ácido nítrico, sendo por isso considerada uma molécula candidata à modulação terapêutica (LENG; ELIAS, 1997; MARTUSCELLI et al., 2000; YÜCEL et al., 2008).

d'Empaire, Baer e Gibson (2006) determinaram que polissacarídeos capsulares de *P. gingivalis* W83 foram capazes de estimular a secreção de várias quimiocinas por macrófagos, contribuindo para a migração de neutrófilos polimorfonucleares. Foi sugerido que essa resposta do hospedeiro aos polissacarídeos capsulares poderia estar envolvida no estabelecimento da lesão inflamatória, observada na doença periodontal.

Embora as citocinas sejam reconhecidas como importantes moduladores na imunopatologia da doença periodontal, muitas vezes sendo capazes de finalizar a inflamação, o desequilíbrio entre citocinas pro e anti-inflamatórias pode produzir efeitos destrutivos aos tecidos (JOHNSON; WOOD; SERIO, 2004). Adicionalmente, a presença de certas citocinas, como IL-1 β , TNF- α e IL-6 e LPS bacteriano parecem prolongar a sobrevivência de neutrófilos, pela interferência na morte programada ou apoptose, o que pode ser potencialmente danoso ao hospedeiro, já que a presença prolongada dessas células de vida curta pode contribuir para a patogênese do processo inflamatório, uma vez que os neutrófilos sofrem alterações em expressão de genes e produção de citocinas, que podem aumentar o recrutamento de neutrófilos e reações teciduais (MIYASAKI, 1991).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS CÃES

Os animais foram selecionados por médicos veterinários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZUSP) e da Clínica Odontológica Veterinária (Odontovet Ltda., São Paulo, SP), e separados em dois grupos: Grupo I, constituído por 50 cães portadores de periodontite, apresentando evidência clínica de sangramento ou supuração à sondagem, e/ou perda de inserção e bolsa periodontal ≥ 5 mm. A idade desses animais variou de 2 a 6 anos de idade, sendo 26 machos e 24 fêmeas; Grupo II, constituído por 50 cães com periodonto clinicamente saudável, com profundidade de sondagem de até 3 mm e ausência de sinais de inflamação. A idade dos animais variou de sete meses a 10 anos, sendo 21 machos e 29 fêmeas. Como critério de exclusão, nenhum dos animais envolvidos nesse estudo havia sido submetido ao uso de antibióticos nos três meses que antecederam a coleta.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS SUBGENGIVAS

Antes de serem realizadas as coletas, os animais foram anestesiados segundo padrões veterinários, isto é, indução com propofol (2mg/Kg) e diazepam (5,5mg/Kg), via intramuscular, e manutenção com isoflurano inalatório. Em seguida, foi realizada a remoção do biofilme bacteriano supragengival com gaze esterilizada e, posteriormente, coletado o biofilme subgengival inserindo-se três cones de papel absorvente esterilizados (No. 40, Tanariman Ind. Ltda. AM, Brasil) na região apical das bolsas periodontais, permanecendo por 60 segundos. Um sítio periodontal por animal foi selecionado para a coleta. Em seguida, os cones foram transferidos e transportados em meio de pré-reduzido VMGA III (Möller, 1966). Todos os espécimes coletados foram processados dentro de um intervalo máximo de 4 horas.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Os espécimes clínicos coletados foram dispersos em agitador de tubos tipo vortex, por 60 segundos, e diluídos em solução de diluição VMG I (Möller, 1966). Aliquotas de 0,1ml de diluições pré-estabelecidas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) foram transferidas e semeadas em placas com ágar-sangue-brucella (Difco Laboratories), adicionado de 5% de sangue desfibrinado de

cavalo, suplementado com menadiona (0.0001 mg/ml) e hemina (0.0005 mg/ml), para o isolamento de *Porphyromonas* spp., e ágar Omata & Disraely (Omata & Disraely, 1956) para o isolamento de *Fusobacterium* spp. As placas inoculadas foram incubadas em condições de anaerobiose (90% N₂ + 10% CO₂), a 37 °C, durante 7 a 10 dias. Após o tempo de incubação, foram observadas as colônias características pigmentadas de marrom a preto, sobre o ágar sangue, representativas do gênero *Porphyromonas*, e sobre o ágar Omata & Disraely, colônias características de espécies de *Fusobacterium*, de cor acinzentada. Uma a quatro colônias de cada bactéria foram subcultivadas para obtenção de cultura pura e para a determinação do tipo respiratório.

4.4 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA (HOLDEMAN et al., 1977)

As colônias características foram identificadas, presuntivamente, pela coloração de Gram, produção de catalase, H₂S e indol, e hidrólise de esculina e amido. A identificação definitiva foi realizada pela fermentação da glicose, sacarose, xilose, lactose e maltose, realizada em meio peptona-extrato-de-levedura (PY). Para as espécies de *Porphyromonas*, foi utilizado o kit de identificação RAPID 32A (bioMérieux). As espécies *P. gulae*, *P. macacae* e *F. canifelinum* foram identificadas por sequenciamento de DNA, realizado no Laboratório de Anaeróbios do Dr. Sidney M. Finegold da Faculdade de Medicina da UCLA, Los Angeles, Ca, E.U.A. Adicionalmente, os isolados de *Fusobacterium* foram avaliados quanto à suscetibilidade à levofloxacina (Conrads et al., 2004). Todos os isolados em cultura pura e identificados foram estocados em leite desnatado (10%) a -20 °C e -80 °C.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ALGUNS FATORES DE VIRULÊNCIA

4.5.1 Produção de Hemolisinas (AVILA-CAMPOS et al., 1995)

Foi determinada sobre ágar-soja-tripticaseína, contendo 5% de sangue desfibrinado de cavalo, 0.0005 mg/ml de hemina e 0.0001 mg/ml de menadiona. As placas foram inoculadas, em duplicata, com o replicador de Steers (Cefar Ltda., São Paulo, SP), transferindo, a partir da cultura padronizada de 10⁸ células/ml (escala 0,5 McFarland), um inóculo final de aproximadamente 10⁵ células/ml/ponto. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose (90% N₂/ 10% CO₂), a 37 °C, por 48 horas ou 5 dias, segundo cada organismo

em estudo. A produção de hemolisinas foi identificada através da visualização de um halo claro ao redor do crescimento bacteriano.

4.5.2 Reação de Hemaglutinação (HA) (VEL et al., 1986)

Foi realizada em placas de microtitulação com fundo em “V”, utilizando-se sangue humano de um único doador sadio e do sexo masculino (A, Rh +), que foi coletado e mantido em solução Alsever (10%), a 4 °C, até uma semana.

Inicialmente, eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina-fosfatada-tamponada (PBS) (0,01M, pH 7.3), por centrifugação (2.000 x g, 4 °C, 5 min) e ressuspendidos na concentração de 1% na mesma solução. As células bacterianas foram cultivadas em caldo infuso cérebro-coração (BHI) suplementado com extrato de levedura (0,5%) e incubadas (anaerobiose, 37 °C, 48 horas). Foram, então, lavadas três vezes em PBS (10.000 x g, 5 min) e ressuspendidas na mesma solução, atingindo-se, aproximadamente, 10⁸ células/ml (escala 0,5 McFarland).

Após esse processo, foram adicionados nas microplacas 50 µl de PBS e 50 µl de suspensão bacteriana em diluições seriadas (1:1 até 1:10.000), em PBS, em base 2. Em seguida, adicionou-se, a cada diluição, 50 µl da suspensão de eritrócitos. As misturas foram ligeiramente homogeneizadas e mantidas a 37 °C, por 1 hora, e observadas após incubação, a 4 °C, por uma noite. Como controle negativo da HA foi usada uma suspensão de eritrócitos (1%) em PBS, sem a adição de células bacterianas. O título de hemaglutinação foi definido como o recíproco da maior diluição bacteriana que apresentou aglutinação de eritrócitos.

4.5.3 Reação de Inibição de Hemaglutinação (IHA) (VEL et al., 1986)

Foram preparadas soluções de glicose, galactose, manose e lactose, em PBS, atingindo-se a concentração final de 60 mM. Para cada 9,9 ml de solução de carboidrato, foi adicionado 0,1 ml de eritrócitos lavados, dando a concentração final de 1%. Após as respectivas diluições bacterianas (50µl), foram adicionados, em cada poço, 50 µl de eritrócitos tratados com os respectivos carboidratos. Em seguida, as placas foram ligeiramente homogeneizadas e incubadas a 37 °C, por 1 h, sendo observadas depois de incubadas a 4 °C,

por uma noite. O título de IHA foi determinado como o recíproco da maior diluição capaz de inibir a HA. Como controle, foi utilizada uma suspensão de eritrócitos (1%) com a bactéria-teste e, como controle negativo de IHA, suspensão de eritrócitos sem a adição de carboidratos.

4.5.4 Suscetibilidade ao Soro (NAVAMAR et al., 1991)

Foi determinada utilizando-se soros de humano, equino e canino, mantidos em alíquotas de 1,0 ml, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a realização dos testes. As bactérias foram crescidas em caldo BHI suplementado (anaerobiose, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 72 horas) e os inóculos preparados para 10^8 células/ml. Alíquotas bacterianas de 0,1 ml foram misturadas com 0,1 ml do soro a ser testado (humano, equino ou canino), e essa mistura foi incubada em anaerobiose, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 4 horas. Após esse tempo, alíquotas das misturas foram removidas e inoculadas com o auxílio do replicador de Steers (10^5 células/ml/ponto) em placas de ágar-sangue, suplementado com 0,0005 mg/ml de hemina e 0,0001 mg/ml de menadiona, e incubadas por 48 horas. A leitura foi realizada pela contagem de colônias em relação ao controle (soro inativado a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 30 minutos). A inibição total de crescimento foi considerada como suscetível ao soro.

4.5.5 Determinação da Presença de Fímbrias

As cepas bacterianas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) usando-se a coloração negativa. Isolados representativos de *F. nucleatum*, *F. canifelinum*, *P. gingivicanis* e *P. gulae* foram crescidos em caldo BHI, em anaerobiose, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. Posteriormente, alíquotas de 1 ml foram transferidas para tubo eppendorf e lavadas três vezes, com 1 ml de PBS (0,01M, pH 7,3) e coradas com ácido fosfotúngstico (2%). Após 30 segundos, alíquotas dessa mistura foram depositadas sobre telas de cobre (200-mesh), recobertas com película de parladion (Electron Microscopy Sciences, EUA) e secas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 (Japão).

4.6 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ÀS DROGAS ANTIMICROBIANAS (CLSI, 2007)

Foi determinada utilizando-se o método de diluição em ágar, segundo CLSI 2007, com ágar-sangue-brucella, suplementado com 0,0005 mg/ml de hemina e 0,0001 mg/ml de menadiona e acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo. Os antibióticos testados foram: amoxicilina, clindamicina, eritromicina e tetraciclina (Luper ind. Farm. Ltda., SP); amoxicilina + ácido clavulânico (Smithkline Bucham Brasil Ltda., SP); cefoxitina (Merck, Sharp & Dohme, SP); claritromicina (Boehringer Ingelheim do Brasil Quím. Farm. Ltda., SP); penicilina G (Prodoti Lab. Farm. Ltda., SP) e metronidazol (Aventis Farm. Ltda., SP). Os antibióticos foram avaliados nas concentrações de 0,25 a 512 µg/ml, e meios de cultura sem agentes antimicrobianos foram utilizados como controle.

O inóculo foi preparado em caldo BHI suplementado (10^8 células/ml) e as placas inoculadas, em duplicata, com replicador de Steers (10^5 células/ml/ponto), sendo, posteriormente, incubadas em anaerobiose, a 37 °C, por 48 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de cada agente capaz de inibir totalmente o crescimento macroscópico dos microrganismos. Os pontos críticos utilizados para claritromicina e eritromicina foram segundo o NCCLS (1997).

4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

4.7.1 Detecção do Gene *prtC* Mediador da Produção de Colagenase pela Reação EM Cadeia da Polimerase (PCR) (ODELL et al., 1999)

A extração de DNA de todas as espécies em estudo foi realizada utilizando-se o kit Easy-DNA (Invitrogen, SP) e essas amostras foram estocadas à -20 °C, até o uso. Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador com luz UV com câmara Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120).

A detecção do gene *prtC* foi realizada para todas as espécies de *Porphyromonas*. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas na Tabela 1. A reação de amplificação do

DNA foi realizada em volumes finais de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10 X de tampão PCR, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µl de dNTP (10 mM) (Invitrogen), 0,25 µl de Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen), 1,25 µl de cada iniciador, 7,25 µl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 µl de DNA (1ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94 °C (1 min.); 33 ciclos de 94 °C (1 min.), 55 °C (1 min.), 72 °C (1 min.) e 1 ciclo de 72 °C (10 min.).

Como controle positivo, foi utilizada a cepa *P. gingivalis* ATCC 33277 e, como controle negativo, a mistura dos reagentes com água ultrapura e sem DNA bacteriano. Fragmentos de 815 bp indicaram a amplificação do gene *prtC*. Como controle de peso molecular, foi utilizado o marcador 1 kb DNA ladder.

4.7.2 Tipificação dos Genes Envolvidos na Produção de Fímbrias (*fimA*) (AMANO ET AL., 1999; NAKAGAWA ET AL., 2000)

A detecção por PCR dos cinco tipos do gene *fimA*, que regulam a produção de fímbrias tipos I, II, III, IV e V foi realizada em todas as espécies de *Porphyromonas*. Para a determinação dos tipos fimbriais, foram utilizados iniciadores específicos, segundo a Tabela 1.

A reação de amplificação do DNA foi realizada em volumes finais de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10 X de tampão PCR, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µl de dNTP (10 mM) (Invitrogen), 0,25 µl de Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen), 1,25 µl de cada iniciador, 7,25 µl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 µl de DNA (1ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400), programado para: 1 ciclo de 94 °C (5 min.); 30 ciclos de 94 °C (30 seg.), 58 °C (30 seg.), 72 °C (30 seg.) e 1 ciclo de 72 °C (7 min.).

Foi utilizada, como controle positivo, a cepa *P. gingivalis* ATCC 33277 (*fimA* I-positivo) e, como controle negativo, a mistura dos reagentes com água ultrapura. Fragmentos de 392 bp, 257 bp, 247 bp, 251 bp e 462 bp indicaram, respectivamente, a amplificação dos genes *fimA* I, *fimA* II, *fimA* III, *fimA* IV e *fimA* V. Como controle de peso molecular, foi utilizado o marcador 1 kb DNA ladder.

4.7.3 Detecção dos Genes *tetQ* E *tetM* Mediadores da Resistência à Tetraciclina (MANCH-CITRON et al., 2000)

Todas as espécies de *Porphyromonas* e *Fusobacterium* foram submetidas à amplificação por PCR para detecção dos genes *tetQ* e *tetM*, de resistência à tetraciclina. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1. As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10X de tampão PCR, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µl de dNTP (10 mM) (Invitrogen), 0,25 µl de Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) (Invitrogen), 1,25 µl de cada iniciador, 10 µl de DNA (1 ng) e 7,25 µl de água ultrapura esterilizada.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400), sendo que o gene *tetQ* foi programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.), 40 ciclos de 94 °C (1 min.), 50 °C (1 min.), 72 °C (40 seg.) e 1 ciclo de 72 °C (5 min.), produzindo fragmentos de 605 bp e para *tetM*: 1 ciclo de 94 °C (5 min.); 34 ciclos de 94 °C (1 min.), 55 °C (1 min.), 72 °C (30 seg.); e 1 ciclo de 72 °C (5 min.), produzindo fragmentos de 397 bp. Como controle de peso molecular, foi utilizado o marcador 100 bp ladder (Invitrogen).

4.8 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

4.8.1 Produção de Fatores Quimiotáticos (SUNDQVIST e JOHANSSON, 1979)

Quarenta isolados, sendo oito *F. nucleatum*, 12 *F. canifelinum*, 13 *P. gulae*, duas *P. crevioricanis*, uma *P. circumdentaria*, uma *P. gingivicanis*, duas *P. macacae* e uma *P. catoniae*, isoladas de cães com e sem doença periodontal, foram crescidas em caldo BHI, por 48 horas, lavadas duas vezes em PBS (0,1 M, pH 7,3), a 1.500 x g, por 15 minutos, e padronizadas na concentração de 10⁸ células/ml. O sangue de três doadores saudáveis, participantes da pesquisa, foi coletado e mantido à temperatura ambiente, por 1 hora, e a 4 °C, por duas horas, e, então, centrifugado a 1.200 g, por 30 minutos, a 4 °C, sendo obtido uma mistura de soro humano. Células bacterianas foram centrifugadas e ressuspendidas em 1 ml desse soro, diluído 1:2 em PBS e incubadas a 37 °C, por 30 minutos, para a geração de fatores

quimiotáticos. Após incubação, a bactéria foi separada da suspensão por centrifugação (2.000 x g, 15 minutos, 4 °C). O complemento residual do soro foi, então, inativado (56 °C por 30 minutos). Os soros coletados foram estocados a -80 °C, até sua utilização.

4.8.2 Separação de Neutrófilos (BÖYUM, 1965)

Uma mistura de neutrófilos humanos foi obtida de 80 ml de sangue venoso periférico doado por pesquisadores colaboradores, utilizando tubos com heparina (10 ml sangue:1 ml heparina). Não foi considerado o sexo ou o tipo sanguíneo dos doadores. Após a coleta, o sangue foi centrifugado e a camada de leucócitos foi cuidadosamente removida, com pipeta Pasteur, diluída em igual volume com PBS, depositada em 2 ml de um gradiente descontínuo de Histopaque[®] (Sigma, St. Louis, USA), com igual volume e densidades de 1077 e 1119, e centrifugadas (800 g, 30 min), à temperatura ambiente. A fase contendo os neutrófilos (entre as densidades 1077 e 1119) foi removida cuidadosamente e transferida para tubos siliconizados e lavados duas vezes em PBS. Após esse processo, eritrócitos contaminantes foram removidos por lise hipotônica e, após 30 segundos, a isotonicidade foi restaurada adicionando-se solução salina balanceada de Hank (HBSS). As células foram, então, contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração final de 1×10^6 neutrófilos/ml. A viabilidade foi maior do que 99%, como determinada pela técnica de exclusão com azul de trypan.

4.8.3 Ensaio de Quimiotaxia (HORWITZ e GARRET, 1971)

O ensaio foi realizado utilizando-se a câmara de Boyden modificada (Neuroprobe, Inc, Bethesda, MO, USA), composta por dois compartimentos distintos, separados entre si por uma membrana de policarbonato, com poros de 5 μm de diâmetro (IsoporeTM, Millipore, Irlanda). Em cada ensaio quimiotático foram adicionados 200 μl da suspensão do fator indutor da quimiotaxia (cada um dos 40 isolados) na câmara inferior, e 200 μl de neutrófilos (1×10^6 células/ml) na superior. Como controle negativo, foi utilizado 200 μl de soro (diluído 1:2 com PBS), que passou pelo mesmo processo, sem bactérias, e, como controle positivo, foi utilizado soro humano fresco, ativado com endotoxina de *Escherichia coli* (Interlab Difco,

São Paulo, Brasil). As câmaras foram incubadas a 37 °C, por 30 minutos, e os filtros foram cuidadosamente removidos, lavados para remoção de células não aderidas, submetidos à fixação com metanol e corados com corante de Giemsa. As células foram, então, contadas em microscópio (x1000) (20 campos por filtro, sendo 10 horizontais e 10 verticais). Os resultados desse ensaio foram apresentados como a proporção entre o número de neutrófilos migrados dividido pelo número de neutrófilos que migraram no controle negativo, seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Índice: } \frac{\text{Número de neutrófilos migrados x bactéria}}{\text{Número de neutrófilos migrados x soro}}$$

O número de células migradas para cada bactéria, bem como os índices encontrados e a origem das bactérias (cães com ou sem doença periodontal) foram avaliados e analisados estatisticamente (Tabela 9).

4.8.4 Produção de Citocinas (SHEIKHI et al., 2000)

Vinte e três amostras bacterianas foram utilizadas, sendo 4 *F. nucleatum*, 4 *F. canifelinum*, 5 *P. gulae*, 2 *P. crevioricanis*, 2 *P. macacae*, 2 *P. gingivicanis*, 2 *P. catoniae* e 2 *P. circumdentaria*. Assim, 500 µl de neutrófilos (1 x 10⁶ células/ml), em solução balanceada de Hanks, foram incubados com 500 µl de cada uma das bactérias (10⁸ bactérias/ml) diluídas em PBS, a 37 °C, por 5 horas. Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada (300 g, 4 °C, 10 minutos) e os sobrenadantes, contendo as citocinas liberadas, foram estocados a -80 °C, até o momento do uso. Como controle negativo, 500 µl de neutrófilos (1 x 10⁶ neutrófilos/ml) foram incubados com 500 µl de PBS.

4.8.5 Detecção de Citocinas

As citocinas foram detectadas por kits comerciais para IL-1β, IL-8 e TNF-α (BD PharMingen, San Diego, CA), IL-11 (R&D Systems, Minneapolis, MN) e IL-17 (eBioscience, San Diego, CA), manipulados segundo recomendações dos fabricantes.

5 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os dados obtidos neste estudo foram analisados pelos seguintes testes estatísticos: Qui-quadrado e teste exato de Fisher (relação entre cães com e sem doença periodontal, testes de virulência e suscetibilidade a antibióticos), Anova (teste de quimiotaxia) e GraphPad Prism5, teste não paramétrico de Tukey e t-student com correção de Welch (detecção de citocinas).

Tabela 1. Nomenclatura e sequência dos iniciadores utilizados na detecção de genes e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Genes	Sequência de Iniciadores (5→3)	T° Anelamento (°C)	Referência
<i>tetM</i> (tetraciclina)	-GAC ACG CCA GGA CAT ATG G- -TGC TTT CCT CTT GTT CGA G-	55	MANCH-CITRON et al. (2000)
<i>tetQ</i> (tetraciclina)	-ACT TCC GTA ACC GAG AAT CTG CTG- -TAC CGG ATA GAC TTT GGC TTT TGC-	50	MANCH-CITRON et al. (2000)
<i>prtC</i> (colagenase)	-CGA GAT CGG AGT AGAAGT GCA TC- -CCA CGG TTT GCA GTT CGT ATC G-	55	ODELL et al. (1999)
<i>fimA</i> (tipo I)	-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A- -CTG TGT GTT TAT GGC AAA CTT C-	58	AMANO et al. (1999)
<i>fimA</i> (tipo II)	-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A- -ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G-	58	AMANO et al. (1999)
<i>fimA</i> (tipo III)	-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A- -ATT ACA CCT ACA CAG GTG AGG C-	58	AMANO et al. (1999)
<i>fimA</i> (tipo IV)	-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A- -CTA TTC AGG TGC TAT TAC CCA A-	58	AMANO et al. (1999)
<i>fimA</i> (tipo V)	-AAC AAC AGT CTC CTT GAC AGT G- -TAT TGG GGG TCG AAC GTT ACT GTC-	58	NAKAGAWA et al. (2000)

6 RESULTADOS

Neste estudo foram selecionados 100 cães, sendo 50 com periodontite e 50 sem periodontite. Dos 50 animais com periodontite, 39 (78%) abrigaram *Porphyromonas* spp. e 12 (24%) *Fusobacterium* spp., sendo que 9 (18%) desses animais abrigaram ambos os gêneros. Dos 50 cães sem periodontite, 19 (38%) foram positivos para *Porphyromonas* spp. e 7 (14%) para *Fusobacterium* spp., sendo que três (6%) deles abrigaram ambos os gêneros. Foram obtidos 144 isolados (80 *Porphyromonas* spp. e 64 *Fusobacterium* spp.). As espécies de *Porphyromonas* identificadas foram: 53 *P. gulae*, 8 *P. macacae*, 6 *P. circumdentaria*, 5 *P. crevioricanis*, 4 *P. gingivicanis*, 2 *P. cangingivalis* e 2 *P. catoniae*. Já as espécies de *Fusobacterium* foram: 38 *F. nucleatum* e 26 *F. canifelinum* (Tabela 2).

Observando-se a Tabela 2 pode-se notar que foram isoladas 98 bactérias de ambos os gêneros estudados, em cães com periodontite, enquanto 46 bactérias foram isoladas em cães sem periodontite. Das sete espécies de *Porphyromonas* identificadas, cinco foram isoladas de cães com periodontite, *P. macacae*, *P. crevioricanis*, *P. gingivicanis* e *P. cangingivalis*; entretanto, em cães sem a doença, foram observadas somente *P. gulae*, *P. circumdentaria* e *P. catoniae*. Vale a pena ressaltar que *P. gulae* foi isolada de ambos os grupos de cães, observando-se maior predominância em animais com periodontite. Por outro lado, em ambos os grupos, foram encontradas as duas espécies de *Fusobacterium*: *F. nucleatum* e *F. canifelinum*, em proporções semelhantes, motivo pelo qual não foram observadas diferenças estatísticas.

Nenhuma das espécies de ambos os gêneros estudados hidrolisou esculina ou amido, apresentou motilidade ou produziu H₂S. Devido a semelhanças nas características fisiológico-bioquímicas das espécies de *Fusobacterium* isoladas, incluindo ausência na produção de catalase, a diferenciação entre *F. nucleatum* e *F. canifelinum* foi realizada pela suscetibilidade à levofloxacina, onde a resistência a essa droga foi observada em *F. canifelinum*. As principais características bioquímicas das 80 *Porphyromonas* spp. estão apresentadas na Tabela 3. Todos os isolados das espécies *P. gulae*, *P. macacae*, *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis* e *P. circumdentaria* foram catalase positivos, enquanto que todos os *P. crevioricanis* e *P. catoniae* foram negativos para o mesmo teste.

A identificação das espécies de *Porphyromonas* (52) e *F. nucleatum* (26), em números representativos, foi, também, confirmada pelo sequenciamento de DNA.

Tabela 2. Distribuição das espécies de *Porphyromonas* e *Fusobacterium* isoladas de 42 cães com e 23 sem periodontite.

Espécies Identificadas	Cães com Periodontite Nº (%)	Cães sem Periodontite Nº (%)	Nº isolados Total (%)
<i>P. gulae</i>	38 (38,8)	15 (32,6)	53 (36,8)
<i>P. macacae</i>	8 (8,2)	0	8 (5,5)
<i>P. circumdentaria</i>	0	6 (13,1)	6 (4,2)
<i>P. crevioricanis</i>	5 (5,1)	0	5 (3,5)
<i>P. gingivicanis</i>	4 (4,1)	0	4 (2,8)
<i>P. cangingivalis</i>	2 (2)	0	2 (1,4)
<i>P. catoniae</i>	0	2 (4,3)	2 (1,4)
<i>F. nucleatum</i>	26 (26,5)	12 (26,1)	38 (26,4)
<i>F. canifelinum</i>	15 (15,3)	11 (23,9)	26 (18)
Total	98	46	144

A maioria das cepas isoladas produziram β -hemólise, com exceção de *P. macacae*, *P. catoniae*, *F. nucleatum* e *F. canifelinum* (Tabela 4). Adicionalmente, pode ser observado que todos os isolados foram resistentes ao soro canino. Sete (87,5%) *P. macacae* isolados de cães com periodontite foram resistentes ao soro equino. A maioria dos isolados avaliados, de ambos os gêneros, foi resistente à ação do soro humano, sendo que essa resistência variou de 50 a 100% entre os isolados testados (Tabela 4).

Tabela 3. Características fenotípicas das espécies de *Porphyromonas* isoladas de cães com e sem periodontite.

Características Fenotípicas	<i>P. gulae</i> (n=53) *	<i>P. macacae</i> (n= 8) *	<i>P. cangingivalis</i> (n=2) *	<i>P. crevioricanis</i> (n=5) *	<i>P. gingivicanis</i> (n=4) *	<i>P. circumdentaria</i> (n=6) *	<i>P. catoniae</i> (n=2) *
Fosfatase alcalina	100	100	0	100	100	100	100
Arginina dihidrolase	100	100	100	100	0	100	0
Ác. glutâmico decarboxilase	100	100	100	100	100	100	100
Redução dos nitratos	0	100	0	0	0	0	100
Produção de indol	100	100	100	100	100	100	0
Alfa galactosidase	0	100	0	0	100	0	0
Beta galactosidase	100	100	0	0	100	0	100
Beta galactosidase 6 fosfato	0	0	0	0	0	0	0
Alfa glucosidase	0	0	0	0	0	0	0
Beta N-acetil-glucosaminidase	100	100	0	0	0	0	100
Alfa fucosidase	0	0	0	0	0	0	100
Arginina arilamidase	98,1	0	100	0	0	0	100
Hidrólise de esculina	0	0	0	0	0	0	0
Hidrólise de amido	0	0	0	0	0	0	0
Produção de H ₂ S	0	0	0	0	0	0	0
Teste de motilidade	0	0	0	0	0	0	0
Produção de catalase	100	100	100	0	100	100	0

* Porcentagem de cepas positivas

Tabela 4. Porcentagem de atividade hemolítica e resistência aos diferentes soros das espécies de *Porphyromonas* e *Fusobacterium* isoladas.

Espécies (No.)	Produção β -hemólise (%)	% resistência ao soro		
		canino	equino	humano
Cães com periodontite				
<i>P. gulae</i> (38)	100	100	100	100
<i>P. macacae</i> (8)	0	100	87,5	75
<i>P. cangingivalis</i> (2)	100	100	100	100
<i>P. crevioricanis</i> (5)	100	100	100	100
<i>P. gingivicanis</i> (4)	100	100	100	50
<i>F. nucleatum</i> (26)	0	100	100	92,3
<i>F. canifelinum</i> (15)	0	100	100	66,7
Cães sem periodontite				
<i>P. gulae</i> (15)	100	100	100	86,7
<i>P. circumdentaria</i> (6)	33,3	100	100	83,3
<i>P. catonae</i> (2)	0	100	100	100
<i>F. nucleatum</i> (12)	0	100	100	100
<i>F. canifelinum</i> (11)	0	100	100	100

Das 98 cepas isoladas de cães com e 46 sem periodontite, apenas 15 (15,3%) e 8 (17,4%), respectivamente, foram capazes de produzir hemaglutinação de eritrócitos humanos, com títulos de HA variando de 2 a 64, em animais com doença periodontal, e de 2 a 16 em animais sem a doença. Somente as espécies *P. gulae* e *F. nucleatum* avaliadas apresentaram atividade hemaglutinante. A inibição da hemaglutinação também foi observada quando os açúcares glicose, galactose, manose e lactose foram utilizados (Tabela 5).

Tabela 5. Títulos de hemaglutinação (HA) e de inibição da hemaglutinação (IHA) das cepas hemaglutinantes dos eritrócitos humanos.

Cepas Isoladas	HA (título)	IHA (título)			
		Glicose	Galactose	Manose	Lactose
Cães com periodontite					
<i>P.gulae</i> d8Bp	4	4	4	4	2
<i>P.gulae</i> d8Gp	4	2	4	4	4
<i>P.gulae</i> d8Pp	64	4	2	8	8
<i>P.gulae</i> d8Sp	16	0	0	0	0
<i>P.gulae</i> d10Bp	32	2	4	2	2
<i>P.gulae</i> d10Cp	64	2	4	8	4
<i>P.gulae</i> d10Gp	4	2	4	4	2
<i>P.gulae</i> d20Ap	16	0	0	0	0
<i>P.gulae</i> d20Bp	16	0	0	0	0
<i>P.gulae</i> d20Cp	32	0	0	0	0
<i>P.gulae</i> d20Dp	16	0	0	0	0
<i>P.gulae</i> d30Ap	2	0	2	2	2
<i>P.gulae</i> d30Cp	16	4	8	16	8
<i>P.gulae</i> d30Ep	2	0	0	0	0
<i>F. nucleatum</i> d31df	4	4	0	2	0
Cães sem periodontite					
<i>P.gulae</i> c5Dp	16	0	2	2	4
<i>P.gulae</i> c12Ap	4	2	4	2	2
<i>P.gulae</i> c12Cp	4	0	2	2	2
<i>P.gulae</i> c12Gp	16	4	4	2	2
<i>P.gulae</i> c35Ap	8	2	2	0	2
<i>P.gulae</i> c35Bp	2	0	2	2	0
<i>P.gulae</i> c35Dp	4	2	2	4	2
<i>F. nucleatum</i> c27Bf	4	4	0	0	0

Os perfis de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de animais com e sem periodontite estão descritos nas Tabelas 6 e 7. Todas as espécies de *Porphyromonas* de cães com periodontite avaliadas foram sensíveis à amoxicilina, ampicilina, amoxicilina/clavulanato, cefoxitina, penicilina G e tetraciclina. Somente as espécies de *Fusobacterium* mostraram-se resistentes à ampicilina. Das espécies isoladas, somente as duas *P. cangingivalis* foram sensíveis à claritromicina, enquanto *P. gulae* (68,4%), *P. macacae* (50%), *P. crevioricanis* (60%), *P. gingivicanis* (50%), *F. canifelinum* (100%) e *F. nucleatum*

(96%) foram resistentes a essa droga. As espécies *P. gulae* (34,2%), *P. macacae* (12,5%), *F. canifelinum* (100%) e *F. nucleatum* (96%) apresentaram-se resistentes à eritromicina. Das 98 espécies bacterianas, somente 1 (2,6%) *P. gulae* foi resistente ao metronidazol.

As espécies *P. gulae*, *P. catoniae* e *P. circumdentaria*, isoladas de cães sem periodontite, foram sensíveis à amoxicilina, ampicilina, amoxicilina/clavulanato, cefoxitina, clindamicina, penicilina G e tetraciclina. A resistência à claritromicina foi observada em todas as bactérias analisadas, observando-se em 86,7% dos isolados *P. gulae* e em 100% dos *P. catoniae*, *P. circumdentaria*, *F. canifelinum* e *F. nucleatum*. A resistência para eritromicina foi observada nos isolados de *P. gulae* (73,3%), *F. canifelinum* (90,9%) e *F. nucleatum* (91,7%). Somente 13,3% dos isolados *P. gulae* avaliados foram resistentes ao metronidazol.

Adicionalmente, pode-se observar que os isolados *P. gulae*, de ambos os grupos de cães analisados, apresentaram resistência à claritromicina, eritromicina e metronidazol. Significância estatística foi observada somente em relação à resistência à eritromicina ($P=0,015$ - Teste exato de Fisher).

Dos 98 isolados de cães apresentando periodontite, apenas 22 (57,9%) *P. gulae* e 1 (50%) *P. cangingivalis* abrigaram o gene *prtC*, enquanto que, dos 46 isolados de cães sem a doença, 11 (73,3%) *P. gulae* e 1 (16,7%) *P. circumdentaria* apresentaram o mesmo gene. As demais espécies de *Porphyromonas* não abrigaram esse gene (Figura 1).

Das cinco espécies de *Porphyromonas* isoladas de cães com periodontite, 25 (65,8%) de *P. gulae* apresentaram o gene *fimA* I, e 6 (15,8%), o gene *fimA* tipo II. Igualmente, 2 (40%) *P. crevioricanis* e 2 (100%) *P. cangingivalis* apresentaram *fimA* I. Dos 15 *P. gulae* isolados de cães sem periodontite, 10 (66,7%) abrigaram o gene *fimA* I, 5 (33,3%), o gene *fimA* II, 2 (13,3%), o gene *fimA* III e 3 (20%), o gene *fimA* IV. Adicionalmente, dos 6 *P. circumdentaria*, somente 2 apresentaram, respectivamente, os genes *fimA* I (16,7%) e *fimA* II (16,7%). Dos isolados *P. gulae* avaliados, 6 oriundos de cães com, e 4 de cães sem periodontite foram positivos para ambos os genes *fimA* I e *fimA* II; 2 cepas dessa mesma espécie, isoladas de cães sem doença periodontal, também apresentaram mais de um tipo de um gene para fímbrias, uma sendo positiva para *fimA* I, III e IV, e a outra para *fimA* tipo II e IV (Figura 2; Tabela 8).

Tabela 6. Suscetibilidade a 10 antimicrobianos de 98 isolados de cães com periodontite.

Espécies (no.)/antibiótico	CIM (µg/ml)			% resistência
	Faixa	50%	90%	
<i>P. gulae</i> (n=38)				
Amoxicilina	≤ 0,25-4	≤0,25	1	0
Ampicilina	≤0,25-2	≤0,25	2	0
Amoxicilina/clavulanato	≤0,25-2	≤0,25	0,5	0
Cefoxitina	≤0,25-2	≤0,25	0,5	0
Claritromicina*	≤0,25-≥512	≥512	≥512	68,4
Clindamicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Eritromicina*	≤0,25-32	1	16	34,2
Metronidazol	≤0,25-≥512	≤0,25	0,5	2,6
Penicilina G	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Tetraciclina	≤0,25-0,5	≤0,25	≤0,25	0
<i>P. macacae</i> (n=8)				
Amoxicilina	≤0,25-2	≤0,25	1	0
Ampicilina	≤0,25-0,5	≤0,25	≤0,25	0
Amoxicilina/clavulanato	0,5-2	1	2	0
Cefoxitina	≤0,25-0,5	≤0,25	2	0
Claritromicina*	4-≥512	4	≥512	50
Clindamicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Eritromicina*	≤0,25-32	≤0,25	1	12,5
Metronidazol	≤0,25-1	≤0,25	0,5	0
Penicilina G	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Tetraciclina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
<i>P. cangingivalis</i> (n=2)				
Amoxicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Ampicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Amoxicilina/clavulanato	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Cefoxitina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Claritromicina*	≤0,25-2	2	2	0
Clindamicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Eritromicina*	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Metronidazol	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Penicilina G	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Tetraciclina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
<i>P. crevioricanis</i> (n=5)				
Amoxicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Ampicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Amoxicilina/clavulanato	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Cefoxitina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Claritromicina*	≤0,25-128	1	128	60
Clindamicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Eritromicina*	≤0,25-1	≤0,25	1	0
Metronidazol	≤0,25-0,5	≤0,25	0,5	0
Penicilina G	≤0,25-0,5	≤0,25	0,5	0
Tetraciclina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0

Continua...

Espécies (no.)/antibiótico	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			% resistência
	Faixa	50%	90%	
<i>P. gingivicanis</i> (n=4)				
Amoxicilina	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Ampicilina	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Amoxicilina/clavulanato	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Cefoxitina	$\leq 0,25-0,5$	$\leq 0,25$	0,5	0
Claritromicina*	2-64	2	64	50
Clindamicina	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Eritromicina*	$\leq 0,25-0,5$	0,5	0,5	0
Metronidazol	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Penicilina G	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Tetraciclina	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
<i>F. canifelinum</i> (n=15)				
Amoxicilina	$\leq 0,25-4$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Ampicilina	$\leq 0,25-1$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	6,7
Amoxicilina/clavulanate	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Cefoxitina	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Claritromicina*	128- ≥ 512	≥ 512	≥ 512	100
Clindamicina	$\leq 0,25-0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Eritromicina*	8- ≥ 512	256	≥ 512	100
Metronidazol	$\leq 0,25-2$	$\leq 0,25$	2	0
Penicilina G	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Tetraciclina	$\leq 0,25-0,5$	$\leq 0,25$	0,5	0
<i>F. nucleatum</i> (n=26)				
Amoxicilina	$\leq 0,25-0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Ampicilina	$\leq 0,25-4$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	3,8
Amoxicilina/clavulanate	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Cefoxitina	$\leq 0,25-4$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Claritromicina*	$\leq 0,25-\geq 512$	≥ 512	≥ 512	96
Clindamicina	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Eritromycin*	2- ≥ 512	256	≥ 512	96
Metronidazole	$\leq 0,25-2$	$\leq 0,25$	1	0
Penicillin G	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	0
Tetraciclina	$\leq 0,25-1$	$\leq 0,25$	1	0

Pontos críticos utilizados segundo o CLSI (2007): amoxicilina, $8\mu\text{g/ml}$; ampicilina, $1\mu\text{g/ml}$; Amoxicilina/clavulanato, $4\mu\text{g/ml}$; cefoxitina, $32\mu\text{g/ml}$; clindamicina, $4\mu\text{g/ml}$; metronidazol, $16\mu\text{g/ml}$; penicilina G, $1\mu\text{g/ml}$; tetraciclina, $8\mu\text{g/ml}$.

* Pontos críticos utilizados para eritromicina ($8\mu\text{g/ml}$) e claritromicina ($8\mu\text{g/ml}$), segundo o NCCLS (1997).

Tabela 7. Suscetibilidade a 10 antimicrobianos de 46 isolados de cães sem periodontite.

Espécies (no.)/antibiótico	CIM (µg/ml)			% resistência
	Faixa	50%	90%	
<i>P. gulae</i> (n=15)				
Amoxicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Ampicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Amoxicilina/clavulanato	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Cefoxitina	≤0,25-0,5	0,5	0,5	0
Claritromicina*	≤0,25-≥512	≥512	≥512	86,7
Clindamicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Eritromicina*	≤0,25-64	8	64	73,3
Metronidazol	≤0,25-≥512	1	8	13,3
Penicilina G	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Tetraciclina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
<i>P. catoniae</i> (n=2)				
Amoxicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Ampicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Amoxicilina/clavulanato	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Cefoxitina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Claritromicina*	16	16	16	100
Clindamicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Eritromicina*	2	2	2	0
Metronidazol	1	1	1	0
Penicilina G	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Tetraciclina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
<i>P. circumdentaria</i> (n=6)				
Amoxicilina	≤0,25-1	1	1	0
Ampicilina	≤0,25-0,5	0,5	0,5	0
Amoxicilina/clavulanato	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Cefoxitina	≤0,25-0,5	0,5	0,5	0
Claritromicina*	16-≥512	32	≥512	100
Clindamicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Eritromicina*	≤0,25-4	≤0,25	4	0
Metronidazol	≤0,25-2	2	2	0
Penicilina G	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Tetraciclina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0

Continua...

Espécies (no.)/antibiótico	CIM (µg/ml)			% resistência
	Faixa	50%	90%	
<i>F. canifelinum</i> (n=11)				
Amoxicilina	≤0,25-1	≤0,25	1	0
Ampicilina	≤0,25-4	≤0,25	≤0,25	9
Amoxicilina/clavulanato	≤0,25-2	≤0,25	≤0,25	0
Cefoxitina	≤0,25-16	≤0,25	≤0,25	0
Claritromicina*	32-≥512	256	≥512	100
Clindamicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Eritromicina*	0,5-≥512	≥512	≥512	90,9
Metronidazol	≤0,25-1	≤0,25	0,5	0
Penicilina G	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Tetraciclina	≤0,25-1	≤0,25	≤0,25	0
<i>F. nucleatum</i> (n=12)				
Amoxicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Ampicilina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Amoxicilina/clavulanato	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Cefoxitina	≤0,25-1	≤0,25	≤0,25	0
Claritromicina*	128-≥512	≥512	≥512	100
Clindamicina	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Eritromicina*	1-≥512	≥512	≥512	91,7
Metronidazol	≤0,25-8	0,5	2	0
Penicilina G	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0
Tetraciclina	≤0,25-2	≤0,25	≤0,25	0

Pontos críticos utilizados segundo o CLSI (2007): amoxicilina, 8µg/ml; ampicilina, 1µg/ml; Amoxicilina/clavulanato, 4µg/ml; cefoxitina, 32µg/ml; clindamicina, 4µg/ml; metronidazol, 16µg/ml; penicilina G, 1µg/ml; tetraciclina, 8µg/ml.

* Pontos críticos utilizados para eritromicina (8µg/ml) e claritromicina (8µg/ml), segundo o NCCLS (1997).

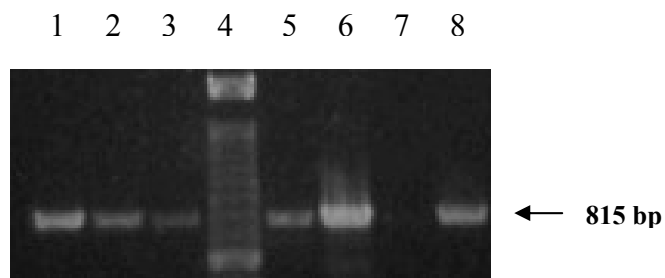


Figura 1. Detecção do gene *prtC* em espécies de *Porphyromonas* isoladas. Colunas 1, 2 e 3, respectivamente: *P. gulae* d30Bp, *P. gulae* d30Cp, *P. crevioricanis* d29Bp; coluna 4, 1 kb DNA Ladder; colunas 5 e 6, respectivamente: *P. gulae* d31Ap e *P. gulae* d31Bp; coluna 7, controle negativo; coluna 8, cepa d7Lp, controle positivo.

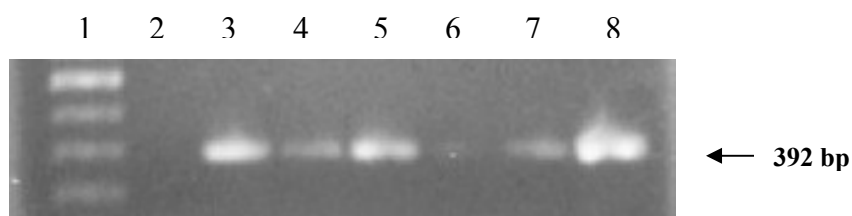


Figura 2. Detecção do gene *fimA I* em espécies de *Porphyromonas* isoladas. Coluna 1, 1 kb DNA Ladder; coluna 2, controle negativo; colunas 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente: *P. gulae* d8Bp, *P. gulae* d8Gp, *P. gulae* d8Pp, *P. gulae* d8Sp e *P. gulae* d10Bp; coluna 8, *P. gingivalis* ATCC 33277 *fimA I*(controle positivo).

Tabela 8. Determinação dos tipos fimbriais em espécies de *Porphyromonas*.

Espécies (N ^o .)	<i>fimA</i> I	<i>fimA</i> II	<i>fimA</i> III	<i>fimA</i> IV	<i>fimA</i> V
Cães com periodontite					
<i>P. gulae</i> (38)	25 (65,8)	6 (15,8)	0	0	0
<i>P. macacae</i> (8)	0	0	0	0	0
<i>P. crevioricanis</i> (5)	2 (40)	0	0	0	0
<i>P. gingivicanis</i> (4)	0	0	0	0	0
<i>P. cangingivalis</i> (2)	2 (100)	0	0	0	0
Cães sem periodontite					
<i>P. gulae</i> (15)	10 (66,7)	5 (33,3)	2 (13,3)	3 (20)	0
<i>P. circumdentaria</i> (6)	1 (16,7)	1 (16,7)	0	0	0
<i>P. catoniae</i> (2)	0	0	0	0	0

A presença de fimbrias não foi observada por microscopia eletrônica de transmissão em nenhuma das cepas estudadas. Por outro lado, em *P. gulae* foi verificada a presença de cápsula (Figura 3).

A resistência à tetraciclina foi determinada pela detecção dos genes *tetQ* e *TetM*, nos isolados de ambos os gêneros estudados, sendo observado que a faixa de detecção desses genes foi baixa. O gene *tetQ* foi observado em *P. gulae*, isolados de cães com (5,2%) e sem (6,7%) periodontite. *P. macacae* e *F. canifelinum*, isolados desses animais, apresentaram o gene em 25% e 13,3%, respectivamente. Já o gene *tetM* foi detectado em 3,8% dos *F. nucleatum*, isolados de cães com periodontite, e em 50% dos *P. catoniae* de cães sem periodontite (Figuras 4A e 4B).

No ensaio de quimiotaxia de neutrófilos, foram selecionados, aleatoriamente, 40 isolados bacterianos de ambos os grupos de animais estudados. Todos os 40 isolados avaliados foram capazes de ativar quimiotaxia de neutrófilos humanos, sendo observada diferenças significativas entre o grupo “outras *Porphyromonas*”, quando comparado com *F. nucleatum* e com *F. canifelinum* ($P < 0.02$) (Tabela 9). Os níveis de IL-1 β , IL-8, TNF- α e IL-11 foram significativamente mais elevados em relação ao controle negativo ($P < 0.05$). Pode-se observar que IL-1 β foi significativamente liberada em níveis elevados por neutrófilos estimulados por *F. nucleatum* (984 pg/ml), *F. canifelinum* (1557 pg/ml), *P. cangingivalis* (1779 pg/ml), em relação ao controle negativo (115 pg/ml). Adicionalmente, IL-8 foi a mais secretada por todas as espécies testadas, sendo que *P. gulae* (2426 pg/ml), *P. crevioricanis* (3348 pg/ml), *P. macacae* (3574 pg/ml), *F. nucleatum* (2998 pg/ml) e *F. canifelinum* (2813 pg/ml) foram as que mais induziram a secreção desta quimiocina, em relação ao controle negativo (567 pg/ml). IL-11 não foi liberada quando neutrófilos foram estimulados pelas espécies de *Fusobacterium*. Por outro lado, *P. gulae* (1800 pg/ml) foi a espécie que mais estimulou a secreção desta citocina em relação ao controle negativo (21 pg/ml). As maiores concentrações de TNF- α foram detectadas quando *P. crevioricanis* (2216 pg/ml), *F. nucleatum* (3579 pg/ml), *F. canifelinum* (1718 pg/ml) e *P. circumdentaria* (2541 pg/ml), estimularam neutrófilos, com controle negativo de 664 pg/ml. Nenhuma das espécies induziu a liberação de IL-17 (Figura 5).

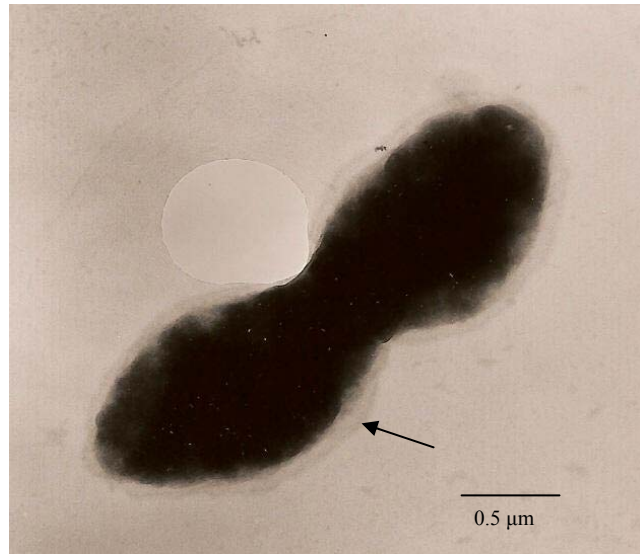


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) por coloração negativa, *P. gulae* (C30Ap). Presença de cápsula e ausência de fimbrias (27.000X).

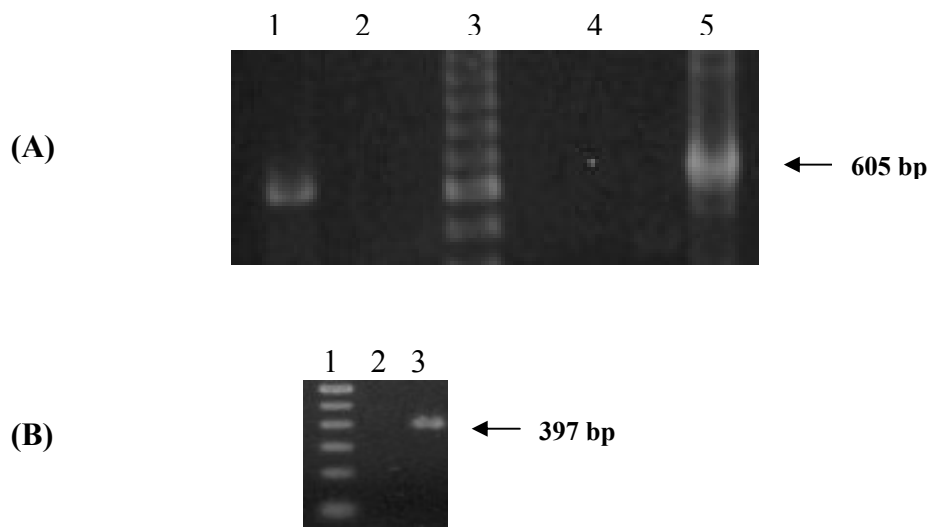


Figura 4. Detecção dos genes *tetQ* e *tetM* nas espécies isoladas.

- (A) Detecção do gene *tetQ*. Coluna 1, *P. gulae* d8Bp; coluna 2, controle negativo; coluna 3, 1 kb DNA Ladder; coluna 4, *F. nucleatum* d32Af e coluna 4, *B. fragilis* P15D, controle positivo.
- (B) Detecção do gene *tetM*. Coluna 1, 1 kb DNA Ladder; coluna 2, *P. gulae* d8Bp; coluna 3, *F. nucleatum* d30Bf.

Tabela 9. Índices de quimiotaxia de neutrófilos induzidos por 40 isolados bacterianos de origem canina.

Espécies bacterianas	Média de células sobre o filtro	Média de índice quimiotático**	Média ± DP*
<i>P. gulae</i> (n = 13)	946 – 1,317	4.95 - 6.89	5.9 ± 0.59
Outras <i>Porphyromonas</i> ^a (n = 7)	1,118 – 1,306	5.85 - 6.83	6.3 ± 0.39
<i>F. nucleatum</i> (n = 8)	954 – 1,161	4.99 - 6.07	5.4 ± 0.41
<i>F. canifelinum</i> (n = 12)	906 – 1,164	4.74 - 6.09	5.5 ± 0.41

*Média aritmética ± desvio padrão do número de bactérias isoladas.

**Número de células migradas para cada bactéria dividida pelo número de células que migraram aleatoriamente para o controle negativo.

^a*P. crevioricanis*, *P. circumdentaria*, *P. gingivicanis*, *P. macacae* e *P. catoniae*

Média do número de células que migraram para: Controle negativo = 191 células e
Controle positivo = 642 células

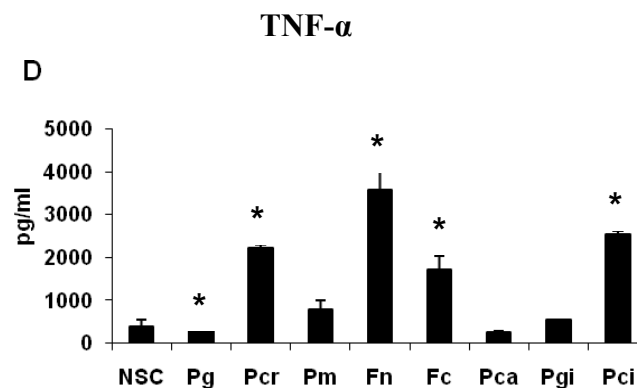
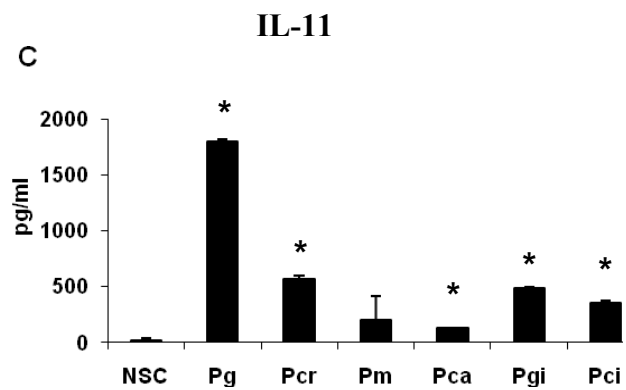
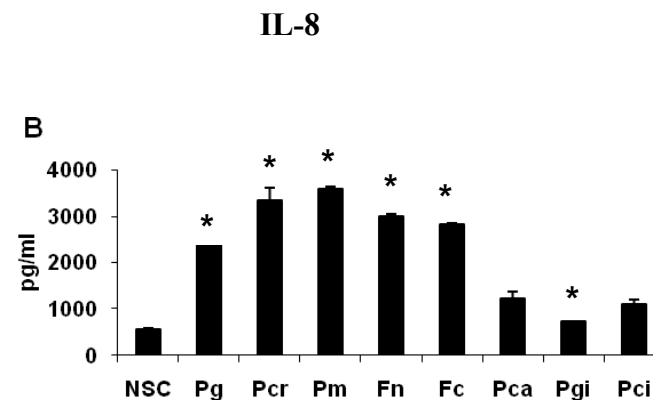
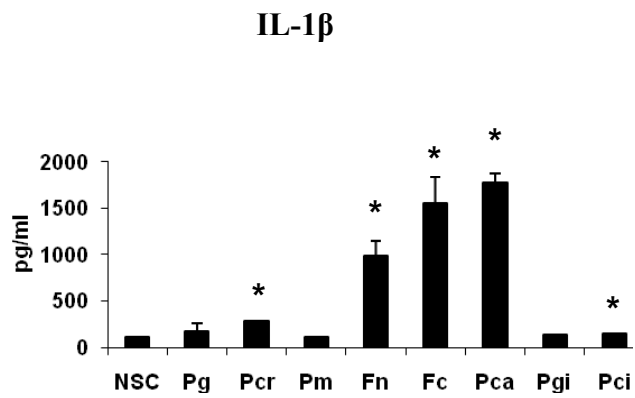


Figura 5. Concentrações de citocinas induzidas por *P. gulae* (Pg), *P. crevioricanis* (Pcr), *P. macacae* (Pm), *F. nucleatum* (Fn), *F. canifelinum* (Fc), *P. cangingivalis* (Pca), *P. gingivicanis* (Pgi), *P. circumdentaria* (Pci), controle com solução neutra (NSC).
*diferença significativa ($P < 0,05$), relativa ao controle.

7 DISCUSSÃO

A periodontite representa um grande problema para animais domésticos, especialmente cães, causando grande desconforto, além de estar associada com efeitos sistêmicos, tais como alterações histológicas renais, lesões nos vasos sanguíneos e coração, inflamação hepática, presença bacteriana no trato respiratório, baixo peso e morte prematura (DUPONT, 1998; PAVLICA et al., 2008).

Na periodontite canina, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* são os gêneros mais frequentemente isolados; entretanto, são observadas diferenças qualitativas significativas com relação às respectivas espécies de origem humana (ELLIOT et al., 2005; HARDHAM et al., 2005a; SYED; SVANBERG; SVANBERG, 1981). Neste estudo, a presença de espécies de ambos os gêneros foi observada nos dois grupos de cães analisados, sugerindo-se que esses gêneros formam parte da microbiota bucal e periodontal desses animais, concordando com Syed, Svanberg e Svanberg (1981).

Das espécies de *Porphyromonas* isoladas, *P. gulae* esteve presente em ambos os grupos de animais, com e sem periodontite, sendo notado em maior número no quadro periodontal (38,8%). Adicionalmente, se considerarmos, dentre as espécies isoladas do gênero *Porphyromonas*, em ambos os grupos de cães, a presença desse microrganismo foi maior (66,6% na periodontite e 65,2% no periodonto sadio). Da mesma forma, *F. nucleatum* e *F. canifelinum* foram encontrados em ambos os quadros clínicos. Esses resultados sugerem que as espécies estudadas, particularmente *P. gulae*, *F. nucleatum* e *F. canifelinum*, fazem parte da microbiota periodontal canina e que, da mesma forma que é observado em humanos, essas bactérias tendem a aumentar numericamente nos processos inflamatórios. Por outro lado, embora possa ser prematuro afirmar, tudo leva a crer que as outras espécies, particularmente do gênero *Porphyromonas*, constituam-se em microrganismos exógenos ou que não teriam participação efetiva no quadro de periodontite, uma vez que o número de isolados em ambos os cães foi baixo, como observado na Tabela 2.

Em nosso estudo, foram observadas diferenças bioquímicas das espécies de origem animal, conforme já descrito na literatura (FOURNIER et al., 2001; ELLIOT et al., 2005). Dentre essas características, destaca-se a produção da enzima catalase, em que é sabido que espécies de origem humana como *P. catoniae*, não a produzem. Como observado na Tabela 2, essa espécie foi isolada de cães com periodonto sadio, o que indica que, provavelmente, o animal tenha sido contaminado pelo seu proprietário, ou outra fonte, constituindo-se, com isso, um microrganismo exógeno à microbiota bucal canina (WILLEMS; COLLINS, 1995).

Por outro lado, também foi possível observar a heterogeneidade das espécies isoladas do gênero *Porphyromonas* de origem canina, destacando-se, por exemplo, que, dentre as sete espécies isoladas, somente *P. crevioricanis* não apresentou capacidade de produzir a enzima catalase. Com relação às espécies de *Fusobacterium* isoladas, o comportamento relacionado à produção dessa enzima foi aquele já conhecido pela literatura humana, isto é, não produziu catalase.

Com relação às espécies de *Fusobacterium*, foi observada uma similaridade entre as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Segundo Conrads, Citron e Goldstein (2005), a resistência à fluoroquinolona (levofloxacina- MIC > 4µg/ml) seria característica de *F. canifelinum* e constituiria-se em um importante teste para a diferenciação dessas espécies.

Os processos periodontais (gingivite e periodontite) em humanos e animais, devem-se às alterações no equilíbrio da microbiota residente bucal. Braga et al. (2005) relataram que, em infecções periodontais de cães, seria observado, predominantemente, espécies do gênero *Porphyromonas* seguidas de *Fusobacterium*. Isso foi observado, também, em nosso estudo (Tabela 2).

Os resultados encontrados neste estudo discordam daqueles observados por Hardham et al. (2005b), que relataram a predominância da espécie *P. macacae*, seguida de *P. gulae*, nos cães com periodontite analisados. Essa discrepância pode ser explicada pela metodologia utilizada em cada estudo. Em nosso trabalho, todas as amostras subgingivais coletadas foram cultivadas para a obtenção de cultura pura, sendo, posteriormente, identificadas pelos métodos descritos anteriormente. No estudo citado, entretanto, a presença desses microrganismos foi determinada por sequenciamento de DNA, diretamente das amostras clínicas.

Embora seja reconhecido que existem diferenças qualitativas entre a microbiota bucal de humanos e animais e a capacidade patogênica desses microrganismos, pouco é conhecido sobre a prevalência, patogenicidade e suscetibilidade às drogas antimicrobianas, em termos fenotípicos e genotípicos, de isolados bacterianos de origem animal, particularmente cães, considerados de estimação (HAMADA et al., 2008).

A produção de hemolisinas por *P. gingivalis* de origem humana, parece estar relacionada à aquisição de ferro e hemina, degradação de tecidos periodontais e de componentes do sistema-complemento, além da capacidade de inativação de inibidores de proteases específicos do hospedeiro (CHU et al., 1991; GENCO, 1995). Em nosso estudo, *P. gulae*, *P. crevioricanis*, *P. cangingivalis* e *P. circumdentaria* foram capazes de produzir hemólise total e foram resistentes ao soro, características que podem favorecer a manutenção desses microrganismos na cavidade bucal daqueles animais. Em 1997, Hudspeth et al.

observaram a produção de hemolisina tipo beta em *P. gingivalis*, *P. macacae* e *P. cangingivalis* isoladas de cães, além de diferenças na lise de eritrócitos, de diversas origens, que poderiam indicar alguma especificidade para a atividade hemolítica.

Em nosso estudo, os isolados bacterianos apresentaram resistência aos soros canino, equino e humano. Essa resistência poderia estar relacionada à virulência dos isolados animais, sendo que a presença de LPS, cápsula e proteinases têm sido apontadas na literatura como importantes componentes envolvidos na resistência ao soro (GRENIER, 1992; GRENIER; BÉLANGER, 1991; POPADIAK et al., 2007; POTEPA; PIKE, 2009). Segundo Taylor (1983), a sensibilidade ao sistema bactericida do soro é uma característica de muitas bactérias Gram negativas. Ainda são necessários, entretanto, outros estudos para determinar o papel que essas características representam no processo periodontal canino.

A presença de cápsula em *P. gulae* foi observada pela microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3), sendo que essa estrutura pode participar na adesão e hemaglutinação de eritrócitos. A capacidade bacteriana de hemaglutinação tem sido apontada como importante fator na aderência aos tecidos do hospedeiro, bem como na adesão e lise de eritrócitos. Fímbrias, hemaglutininas e/ou proteinases cisteínas vêm sendo citadas, ao longo dos anos, como responsáveis por tal atividade (CHANDAD; MOUTON, 1995; DECARLO et al., 1999). O processo de hemaglutinação em bactérias anaeróbias, isoladas de humanos e animais tem se mostrado heterogêneo (NAKANO, 2005; ALMEIDA, 2007).

Laliberté e Mayrand (1983) observaram que bactérias produtoras de pigmento negro, isoladas de cães, gatos e guaxinins, apresentaram capacidade de hemaglutinar eritrócitos de carneiro. Segundo a literatura, *P. gulae* e *P. crevioricanis* são capazes de hemaglutinar eritrócitos, enquanto *P. cangingivalis*, *P. gingivicanis*, *P. macacae* e *P. circumdentaria* não apresentam tal capacidade (Fournier et al., 2001; Collins et al., 1994; Hirasawa & Takada, 1994; Love et al., 1992). Os resultados obtidos em nosso estudo concordam com essa observação, onde somente *P. gulae* e *F. nucleatum* apresentaram atividade hemaglutinante. Entretanto, é importante ressaltar que o ensaio de hemaglutinação neste estudo foi realizado utilizando-se eritrócitos humanos, o que certamente poderá fornecer dados discrepantes com aqueles observados na literatura.

Em nosso trabalho, somente dois isolados de *F. nucleatum* apresentaram capacidade de hemaglutinação. Duas cepas de *F. nucleatum* apresentaram perfis similares de hemaglutinação em sangue humano. Vincent, Falkler e Craig (1983) não observaram hemaglutinação de eritrócitos de carneiro por *F. nucleatum*. Essa discordância pode ser

explicada pela presença de receptores específicos na superfície das hemácias de diferentes origens.

O tratamento antimicrobiano empírico inadequado, que é observado na clínica humana e, mais recentemente, na clínica veterinária, constitui-se o principal mecanismo de seleção de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (GUARDABASSI et al., 2004). Em nosso estudo, ambos os gêneros avaliados foram sensíveis à maioria dos antibióticos testados, concordando com estudos anteriores (HARVEY et al., 1995; NORRIS; LOVE, 2006). Por outro lado, *Porphyromonas* spp. e *Fusobacterium* spp. apresentaram elevada resistência à claritromicina e eritromicina (Tabelas 6 e 7), concordando com Radice et al. (2006). Curiosamente, *P. gulae*, isolados de cães sem doença periodontal, apresentaram uma elevada resistência à eritromicina, em relação aos isolados de cães com a doença, observando-se diferenças estatísticas significativas ($P=0.015$, Teste de Fisher). Segundo Guardabassi (2004), a resistência aos antimicrobianos, em isolados de animais sem processos infecciosos, vem aumentando gradativamente devido ao uso inadequado de antibióticos e à transmissão horizontal de genes de resistência entre as cepas animais. Surpreendentemente foram observadas neste estudo cepas *P. gulae* resistentes ao metronidazol, sendo 1 oriunda de animal doente (2,6%) e 2 (13,3%) de animais sem periodontite. Esses isolados resistentes serão melhor caracterizados em nosso laboratório.

Embora todos os isolados bacterianos estudados tenham apresentado sensibilidade à tetraciclina, em alguns deles foi possível a detecção dos genes *tetQ* e *tetM*, relacionados à resistência a essa droga. É sabido que, a maioria dos genes codificando resistência à drogas antimicrobianas, precisam ser ativados, muitas vezes pela inserção de segmentos genéticos ou transposons (ARSEZE; TOMASETIG; BOTTA, 2000), o que, provavelmente, não ocorreu nos isolados avaliados.

Em nosso estudo, os pontos críticos utilizados foram segundo o CLSI (2007), que fornece esses dados para as drogas, quando estão bem estabelecidos, para a utilização nos testes de suscetibilidade a antimicrobianos para anaeróbios. Entretanto, devido à divergências nos pontos críticos dos macrolídeos para estas bactérias, esses dados não foram fornecidos no manual utilizado, motivo pelo qual foram utilizados os pontos críticos fornecidos pelo manual anterior, NCCLS (1997).

A collagenase, juntamente com a proteinase cisteína, arginina gingipaína, produzida por *P. gingivalis*, parecem ser responsáveis pela degradação de colágeno humano tipo I, importante componente do periodonto e principal suporte da estrutura dental (HOULE et al., 2003; WITTSTOCK et al., 2000). Em nosso estudo, espécies de *Porphyromonas* abrigaram o

gene *prtC*, que codifica uma proteína colagenolítica (Figura 1). Isso pode representar algum potencial virulento desses isolados caninos, com alguma contribuição no desenvolvimento da doença periodontal no cão.

A presença de fímbrias na superfície bacteriana colabora, principalmente, com o processo adesivo às células epiteliais e a outros microrganismos (coagregação), auxiliando, dessa forma, na colonização bacteriana (HAMADA et al., 2008). Bolstad et al. (2006) relataram a ausência dessas estruturas em *F. nucleatum* de origem humana. Em *P. gingivalis*, entretanto, a presença dessas estruturas tem sido extensivamente estudada (NAKAGAWA et al., 2000; UMEMOTO; HAMADA, 2003; HAMADA et al., 2008). Em nosso estudo, as *P. gulae* examinadas pela microscopia eletrônica de transmissão não apresentaram estruturas semelhantes às fímbrias. A ausência desses apêndices pode ter sido devido aos repiques sucessivos para a manutenção bacteriana ou pela falta de aprimoramento da técnica utilizada.

Estudos realizados em *P. gingivalis* de origem humana têm mostrado que os tipos fimbriais I e V estariam associados a sítios periodontais saudáveis ou com pouca inflamação (AMANO et al., 2000; INAWA et al., 2008), enquanto que os tipos II e IV estariam associados a bolsas profundas e periodontite (AMANO et al., 2004; MIURA et al., 2005). A determinação dos tipos fimbriais de *P. gulae*, no nosso trabalho, sugere que os tipos FimA I, II, III e IV estariam relacionados à saúde periodontal dos cães, enquanto que, nos casos de periodontite, só seriam observados os tipos I e II (Tabela 8). Adicionalmente, pode-se sugerir que o tipo fimbrial I é predominante e aumenta consideravelmente na periodontite. Esses dados parecem ser inéditos, uma vez que não foram encontrados estudos sobre a determinação fimbrial em espécies do gênero *Porphyromonas* de origem animal. Por outro lado, é importante salientar que, neste estudo, foram utilizados iniciadores específicos para a detecção dos genes *fimA* de *P. gingivalis* humana. A escolha da utilização deveu-se à estreita similaridade fenotípica e genotípica entre *P. gingivalis* e *P. gulae* (98,1% de similaridade) (FOURNIER et al., 2001; MIKKELSEN et al., 2008).

Leucócitos polimorfonucleares constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos, realizando atividades microbicidas, após a migração para os tecidos infectados, com liberação de peptídios e proteínas antimicrobianas, produção de espécies oxigênio-reativos (ROS) e fagocitose de patógenos (VAN DIKE et al., 1982).

Embora pouco seja sabido sobre os componentes bacterianos capazes de estimular quimiotaxia de neutrófilos, estudos demonstraram a capacidade de bactérias Gram negativas de estimular a resposta migratória de leucócitos (SVEEN, 1977; SUNDQVIST; JOHANSSON, 1980; BAINBRIDGE; DARVEAU, 2001). A ativação do complemento do

soro e a indução de quimiotaxia de neutrófilos parecem ocorrer pela presença de outros componentes bacterianos, além de LPS, como proteinases (POPADIAK et al., 2007).

Em nosso estudo, todos os isolados foram capazes de induzir quimiotaxia de neutrófilos, demonstrando a capacidade das espécies periodontais de origem canina de ativar o complemento do soro humano e gerar fatores quimiotáticos, concordando com Sundqvist e Johansson (1980). Por outro lado, esses autores não observaram diferenças significativas entre a capacidade quimiotática de *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, sendo sugerido que essas espécies não apresentaram grande habilidade em gerar fatores quimiotáticos. Em nosso trabalho, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as espécies individuais de *Porphyromonas* e *Fusobacterium*. Quando as espécies *P. crevioricanis*, *P. circumdentaria*, *P. gingivicanis*, *P. macacae* e *P. catoniae* foram agrupadas (Outras *Porphyromonas*), foram observadas, entretanto, diferenças estatísticas em relação às duas espécies de *Fusobacterium* isoladas ($P < 0,02$) (Tabela 9).

Além da sabida contribuição de neutrófilos na defesa do hospedeiro, esses fagócitos também são capazes de produzir uma variedade de citocinas quando estimulados por patógenos. Essas citocinas são importantes na estimulação e na regulação da resposta inflamatória (GALBRAITH et al., 1997; SCAPINI et al., 2000; SHEIKHI; GUSTAFSSON; JARSTRAND, 2000). Dessas, a IL-1 β e TNF- α são consideradas potentes ativadoras de leucócitos, apresentando capacidade de modificar a permeabilidade vascular e induzir a reabsorção óssea, desempenhando um importante papel na patogênese da doença periodontal (GALBRAITH et al, 1997; YOSHIMURA et al., 1997). Os isolados avaliados em nosso estudo foram capazes de estimular a produção de ambas as citocinas, IL-1 β e TNF- α , em níveis variáveis (Figura 5). Pode ser também observado que *P. cangingivalis* induziu a produção de maiores quantidades de IL-1 β e *F. nucleatum* de TNF- α .

Yoshimura et al. (1997), estudando LPS purificado de diferentes periodontopatógenos, também observaram a produção de diferentes níveis de citocinas, concluindo que outro componente diferente daquele seria responsável por essa variação.

Adicionalmente, espécies de ambos os gêneros foram capazes de estimular elevadas concentrações de IL-8, concordando com estudos de Sheikhi et al. (2000). IL-8 atua ativando a migração de neutrófilos, a expressão de moléculas adesivas de superfície, na liberação de enzimas e na produção de metabólitos oxigênio-reativos (BAGGIOLINI; WALZ; KUNKEL, 1989).

Estudos têm mostrado que IL-11 apresenta um papel fundamental na manutenção da saúde periodontal (YÜCEL et al., 2008), apresentando importantes propriedades anti-

inflamatórias, podendo diminuir a síntese de outras citocinas, tais como TNF- α e IL-1 β , o que evitaria a progressão da doença periodontal (MARTUSCELLI et al., 2000). Neste estudo, IL-11 foi produzida por estimulação das espécies de *Porphyromonas* estudadas, especialmente, por *P. gulae*. Por outro lado, espécies de *Fusobacterium* não foram capazes de induzir a produção dessa citocina, o que pode sugerir a ausência de alguns componentes bacterianos que participam do processo anti-inflamatório, como observado no gênero *Porphyromonas*. Vale a pena ressaltar que o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias parece ser crucial para determinar a imunopatologia da periodontite (JOHNSON; WOOD; SERIO, 2004).

Curiosamente, em nosso trabalho, *P. gulae* estimulou altas concentrações de IL-8 e IL-11 e baixas concentrações de IL-1 β e TNF- α . Por outro lado, as espécies *F. nucleatum* e *F. canifelinum* estimularam elevadas concentrações de IL-1 β , IL-8 e TNF- α e não foram capazes de estimular IL-11 (Figura 5). Concordando com a literatura (JOHNSON; WOOD; SERIO, 2004; YÜCEL et al., 2008), é possível que a produção de IL-11 por *P. gulae* represente algum efeito preventivo sobre a inflamação. Também pode ser sugerido que esta bactéria exerça um papel direto na regulação negativa da progressão da doença periodontal em cães, enquanto que espécies de *Fusobacterium* exerceriam uma ação positiva, de forma isolada ou sinérgica, conforme Figura 5. Dados na literatura, entretanto, têm demonstrado que IL-11, associado a prostaglandinas, teriam efeito sobre osteoclastos, contribuindo para a reabsorção óssea estimulada por pequenas concentrações de LPS purificado (LI et al., 2002).

Interleucina-17 é outra citocina pro-inflamatória, importante em doenças autoimunes, processos alérgicos e tem sido detectada, em níveis elevados, em periodontite humana (LUBBERTS et al., 2004; VERNAL et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2005). Dados na literatura são controversos sobre a capacidade de neutrófilos secretarem IL-17, (FERRETI et al., 2003; LINDÉN; LAAN). Em nosso estudo, IL-17 não foi detectada, podendo ser explicada pelas diferenças metodológicas, pela incapacidade de cepas animais de estimularem a secreção dessa citocina em neutrófilos de origem humana ou mesmo pela possibilidade de neutrófilos não produzirem tal citocina.

Finalmente, a progressão da doença periodontal depende da complexa interação entre bactérias e sistema imune do hospedeiro. Considerando-se a presença das bactérias analisadas neste estudo, aliada à capacidade de estimular a quimiotaxia e a secreção de algumas citocinas, outros estudos são requeridos, visando determinar a real participação destas na patogênese e progressão da doença periodontal em cães.

8 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. As espécies de *Porphyromonas* que formam a microbiota periodontal de cães são diferentes da humana e apresentam predominância de *P. gulae*.
2. A maioria das espécies analisadas foi resistente à claritromicina e eritromicina, e algumas delas apresentam genes ligados à resistência à tetraciclina;
3. As espécies *P. gulae* podem apresentar até 4 tipos de genes fimbriais (*fimA* I, *fimA* II, *fimA* III e *fimA* IV);
4. Todos os isolados estudados foram capazes de induzir a quimiotaxia de neutrófilos;
5. As espécies de *Porphyromonas*, particularmente a *P. gulae*, induziram os neutrófilos a secretar IL-11, que parece participar do efeito anti-inflamatório, na doença periodontal canina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAANS, B.; SHAH, H. *Fusobacterium ulcerans* sp. nov. from tropical ulcers. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 38, p. 447-448, 1988.

ADUSE-OPOKU, J.; SLANEY, J. M.; HASHIM, A.; GALLAGHER, A.; GALLAGHER, R. P.; RANGARAJAN, M.; BOUTAGA, K.; LAINE, M. L.; VAN WINKELHOFF, A. J.; CURTIS, M. A. Identification of the capsular polysaccharide (K- antigen) locus of *Porphyromonas gingivalis*. **Inf. Immun.**, v. 74, p. 449- 460, 2006.

ALAKER, R. P.; ROSAYRO, R.; YOUNG, K. A.; HARDIE, J. M. Prevalence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the dental plaque of dogs. **Vet. Record**, v. 140, p. 147-148, 1997a.

ALLAKER, R. P.; ADUSE-OPOKU, CURTIS, M. A. Molecular characterization of the arginine-specific proteases from feline and canine *Porphyromonas gingivalis* isolates. **J. Dent. Res.**, v. 76, p. 1014-1083, 1997b.

ALMEIDA, F.S. **Espécies do grupo *Bacteroides fragilis* em bezerros com e sem diarreia aguda: ocorrência, fatores de virulência e caracterização molecular.** 94 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ALTERMEYER, W.A. The pathogenicity of the bacteria of appendicitis peritonitis. **Ann. Surg.**, v. 114, p. 158-159, 1941.

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.**, v. 79, p. 1664-1668, 2000.

AMANO, A.; NAKAGAWA, I.; ATAOKA, K.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1426-1430, 1999.

AMANO, A.; NAKAGAWA, I.; OKAHASHI, N.; HAMADA, N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. **J. Periodontol. Res.**, v. 39, p. 136-142, 2004.

AMANO, A.; NAKAGAWA, I.; OKAHASHI, N.; HAMADA, N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. **J. Periodontol. Res.**, v. 39, p. 136-142, 2004.

ANDRIAN, E.; GRENIER, D.; ROUABHIA, M. Porphyromonas gingivalis-epithelial cell interactions in periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 85, p. 392-403, 2006.

ARSEZE, A.R.; TOMASETIG, L.; BOTTA, G.A. Detection of *tetQ* and *ermF* antibiotic resistance genes in *Prevotella* and *Porphyromonas* isolates from clinical specimens and resident microbiota of humans. **J. Antim. Chemother.**, v. 45, p. 577-582, 2000.

AVILA-CAMPOS, M.J. Haemolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains on different blood types. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 37, p. 215- 217, 1995.

BADER, H.I.; GOLDBERGER, P. The passage of intravenously administered tetracycline in the gingival sulcus of dogs. **J. Oral Ther. Pharmacol.**, v.2, p. 324-329, 1966.

BAGGIOLLINI, M., Walz, A.; Kunkel, S.L. Neutrophil activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 1045-1049, 1989.

BENNET, K. W.; ELEY, A. Fusobacteria : new taxonomy and related diseases. **J. Med. Microbiol.**, v. 39, p. 246-254, 1993.

BODINKA, A.; SCHIMIDT, H.; HENKEL, B.; FLEMMING, T. F.; KLAIBER, B.; KARCH, H. Polymerase chain reaction for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 9, p. 161-165, 1994.

BOLSTAD, A. I.; JENSEN, H. B.; BAKKEN, V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9. p. 55-71, 1996.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** v. 21 (suppl. 97), p. 77-89, 1965.

BRADSHAW, B.J.; MARSH, P.D.; WATSON, G.K.; ALLISON, C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4729-4732, 1998.

BRAINBRIDGE, B.W.; DARVEAU, R.P. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand to the innate host defense system. **Acta. Odontol. Scand.**, v. 59, p. 131-138, 2001.

BROOK, I; WALKER, I. The relationship between *Fusobacterium* species and other flora in mixed infection. **J. Med. Microbiol.**, v. 21, p. 93-100, 1986.

CANDELA, T.; MOYA, M.; HAUSTANT, M.; FOUET, A. *Fusobacterium nucleatum*, the first Gram-negative bacterium demonstrated to produce polyglutamate. **Can. J. Microbiol.**, v. 5, p. 627-632, 2009.

CASSATELA, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol. Today**, v. 16, p. 21-26, 1995.

CATO, E. P.; MOORE, L. V. H.; MOORE, W. E. C. *Fusobacterium alocis* sp. nov. and *Fusobacterium sulci* sp. nov. from the Human Gingival Sulcus. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 35, p. 475-477, 1985.

CHANDAD, F.; MOUTON, C. Antigenic, structural, and functional relationships between fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 of *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4755-4763, 1995.

CHANDAD, F.; MOUTON, C. Molecular size variation of the hemagglutinating adhesion HA-Ag2, a common antigen of *Bacteroides gingivalis*. **Can. J. Microbiol.**, v. 36, p. 690-696, 1990.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 232-260, 2001.

Clinical and Laboratory Standards Institute 2007. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*, 7th ed., Approved Standard M11-A7. CLSI, Wayne, P. A., U. S., v. 27, n°2 – CLSI CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.

COLLINS, M. D.; LOVE, D. N.; KARLAJAINEN, A. K.; KANERVO, A.; FORSBLOM, B.; WILLEMS, A.; STUBBS, S.; SARKIALA, E.; BAILEY, G. D.; WIGNEY, D. I.; JOUSIMIES-SOMER. Phylogenetic analysis of members of the genus *Porphyromonas* and description of *Porphyromonas cangingivalis* sp. Nov. and *Porphyromonas cansulci* sp. Nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, p. 674-679, 1994.

COLLINS, S.; LOVE, D. N. Further studies on some physical and biochemical characteristics of asaccharolytic pigmented *Bacteroides* of feline origin. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 72, p. 529-535, 1992.

CONRADS, G.; CITRON, D.M.; MUTTERS, R.; JANG, S.; GOLDSTEIN, E. J. C. *Fusobacterium canifelinum* sp. Nov., from the oral cavity of cats and dogs. **System Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 407-413, 2004.

CONRADS, G.; CLAROS, M.C.; CITRON, D. M.; TYRREL, K. L.; MERRIAM, V.; GOLDSTEIN, J.C. 16S–23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 52, p. 493-499, 2002.

COYKENDALL, A. L.; KACZMAREK, F. S.; SLOTS, J. Genetic heterogeneity in *Bacteroides asaccharolyticus* (Holdeman and Moore 1970) and proposal of *Bacteroides gingivalis* sp. nov. and *Bacteroides macacae* (Slots and Genco) comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 30, p. 559-564, 1980.

D'EMPAIRE, G.; BAER, M. T.; GIBSON, F. C. The K1 serotype capsular polysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* elicits chemokine production from murine macrophages that facilitates cell migration. **Inf. Immun.**, v. 74, p. 6236-6243, 2006.

DAVID, L. L. Survey for collagenase gene *prtC* in *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis* isolated from endodontic infection. **J. End.**, v. 25, p. 555-558, 1999.

DEAN, T.S.; SHINN, D.L.; MCFADZEAN, J.A.; SQUIRES, S.L. Metronidazol in the treatment of gingivitis. **Vet. Rec.**, v. 18, p. 449-450, 1969.

DECARLO, A.; PARAMAESVARAN, M.; YUN, P.L.W.; COLLYER, C.; HUNTER, N. Porphyrin-mediated binding to hemoglobin by the HA2 domain of cysteine proteinases (gingipains) and hemagglutinins from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3784-3791, 1999.

DEHAZYA, P.; COLES, R.S. Extraction and properties of hemagglutinin from cell wall. **J. Bacteriol.**, v. 152, p. 298-305, 1982.

DIAS, I. H. K.; MARSHALL, L.; LAMBERT, P. A.; CHAPPLE, I. L. C.; MATHTHEWS, J. B.; GRIFFITHS, H. R. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* increase the chemotactic

and respiratory burst-priming properties of the 77-amino-acid interleukin-8 variant. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 317-323, 2008.

DIAZ, P.I.; ZILM, P.S.; ROGERS, A.H. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. **Microbiol.**, v. 148, p. 467-472, 2002.

DICKINSON, D. P.; KUBINIEC, M. A.; YOSHIMURA, F.; GENCO, R.J. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit proteina of *Bacteroides gingivalis*. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 1658-1665, 1988.

DOLEN, G.; HEIJL, L.; MALLER, A. Development of plaque and gingivitis following antibiotic therapy in dogs. **J. Clin. Periodontol.** ,v. 9, p. 223-238, 1982.

DORSCH, M.; LOVE, D.; GRAHAM, D. B. *Fusobacterium equinum* sp. nov., from the oral cavity of horses. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, P. 1959-1963, 2001.

DU, L.; PELLEN-MUSSI, P.; CHANDAD, F.; MOUTON C.; BONNAURE-MALLET, M. Conservation of Fimbriae and the Hemagglutinating Adhesin HA-Ag2 among *Porphyromonas gingivalis* strains and other anaerobic bacteria studied by epitope mapping analysis. **Clin. Diag. Laborat. Immunol.**, v. 4, p. 711-714, 1997.

DUERDEN, B. I. Virulence factors in anaerobes. **Clin. Inf. Dis.**, v. 18 (suppl. 4), p. S253-S259, 1994.

DUPONT, G. A. Prevention of periodontal disease. **Vet. Clin. North Am: Small Anim. Pract.**, v. 28, p. 1129-1145, 1998.

DZINK, J.L.; SHEENAN, M.T.; SOCRANSKY, S.S. Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum*, Knorr 1922,; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov. comb. nov. ; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov. , norn. rev. , comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., norn. rev., comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 40, p. 74-78, 1990.

EICK, S.; SELTMANN, T.; PFISTER, W. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm- an *in vitro* study. **J. Clin. Periodontol.**,v. 31, p. 376-383, 2004.

ELLIOT, D. R.; WILSON, M.; BUCKLEY, M. F. DAVID, A. S. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5470-5476, 2005.

FALKLER Jr., W.A.; CLAYMAN, E.B.; SHAEFER, D.F. Haemolysis of human erythrocytes by the *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease. **Arch. Oral Biol.**, v. 28, p. 735-739, 1983.

FALKLER, Jr., W.A.; HAWLEY, C.E. Hemagglutinating activity of *Fusobacterium nucleatum*. **Infect. Immun.**, v. 15, p. 230-238, 1977.

FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontol.** 2000, v. 40, p. 50-76, 2006.

FERRETI, S.; BONNEAU, O.; DUBOIS, G.R.; JONES, C.E. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. **J. Immunol.**, v. 170, p. 2106-2112, 2003.

FINEGOLD, S. M. Anaerobic infections in humans: an overview. **Anaerobe**, v. 1, p. 3-9, 1995.

FINEGOLD, S. M. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of gram-negative anaerobic rods. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 58, p. 1051-1055, 2008.

FINEGOLD, S. M.; BARNES, E. M. Report of the ICSB taxonomic subcommittee on gram-negative anaerobic rods. Proposal that the saccharolytic and asaccharolytic strains at present classified in the species *Bacteroides melaninogenicus* (Oliver and Wherry) be reclassified in two species as *Bacteroides melaninugenicus* and *Bacteroides*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 27, p. 388-391, 1977.

FOTOS, P.G.; LEWIS, D.M.; GERENCSEK, G.F.; GERENSER, M.A.; SNYDER, I.S. Migration and chemiluminescence of polymorphonuclear cells and monocytes to *Bacteroides sonicates*. **Annals Dent.**, v. 51, p. 18-23, 1992.

FOURNIER, D.; MOUTON, C. Phenotypic characterization of human and animal biotypes within the species *Porphyromonas gingivalis*. **Res. Microbiol.**, v. 144, p. 435-444, 1993.

FOURNIER, D.; MOUTON, C.; LAPIERRE, P.; KATO, T.; OKUDA, K.; MÉNARD, C. *Porphyromonas gulae* sp. nov., an anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 1179-1189, 2001.

FUJIWARA, T.; NAKAGAWA, I.; MORISHIMA, S.; TAKAHASHI, I.; HAMADA, S. Inconsistency between the fimbriin gene and the antigenicity of lipopolysaccharides in delected strains of *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 124, p. 333-342, 1994.

FULLMER, H. M.; GIBSON, W. A.; LAZARUS, G. S.; BLADEN, H. A.; KAREN, A. The origin of collagenase in periodontal tissues of man. **J. Dent. Res.**, v. 48, p. 646-651, 1969.

GAETTI-JARDIM, Jr.E.; AVILA-CAMPOS, M.J. Haemagglutination and haemolysis by oral *Fusobacterium nucleatum*. **New Microbiol.**, v.22, p. 63-67, 1999.

GALBRAITH, G.M.P.; HAGAN, C.; STEED, R.B.; SANDERS, J.J.; JAVES, T. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 68, p. 832-838, 1997.

GHARBIA, S. E. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of gram-negative anaerobic rods. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 58, p. 1051-1055, 2008.

GHARBIA, S.E.; SHAH, H.N. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fisifome* subsp. nov. and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *animalis* subsp. nov. as additional subspecies within *Fusobacterium nucleatum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.42, p.296-298, 1992.

GHARBIA, S.E.; SHAH, H.N. Identification of *Fusobacterium* species by the electrophoretic migration of glutamate dehydrogenase and 2-oxoglutarate reductase. **J. Med. Microbiol.**, v. 33, p. 183-188, 1990.

GIBBONS, R. J.; MACDONALD, J. B. Degradation of collagenous substrats by *Bacteroides melaninogenicus*. **J. Bacteriol.**, v. 81, p. 614-621.

GOLDSTEIN, E. J. C.; CITRON, D. M.; FINEGOLD, S. M. Role of anaerobe bacteria in bite-wound infections. **Rev. Inf. Dis.**, v. 6, p. S177-S183, 1984.

GOLUB, L. M. SIEGEL, K.; RAMAMURTHY, N. S.; MANDEL, I. D. Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival diseases in humans. **J. Dent. Res.**, v. 55, p. 1049-1059, 1976.

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

GRAVES, D. T.; NAGUIB, G.; LU, H.; DESTA, T.; AMAR, S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae are pro-inflammatory but do not play a prominent role in the innate immune response to *P. gingivalis*. **J. Endotox. Res.**, v. 11, p. 13-18, 2005.

GRENIER, D. Inactivation of human serum bactericidal activity by a trypsinlike protease isolated from *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1854-1857, 1992.

GRENIER, D.; BELANGER, M. Protective effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles against bactericidal activity of human serum. **Inf. Immun.**, v. 59, p. 3004-3008, 1991.

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

GRENIER, D.; ROY, S.; CHANDAD, F.; PLAMONDON, P.; YOSHIOKA, M.; NAKAYANA, K.; MAYRAND, D. Effect of inactivation of the arg- and/or lys-gingipain gene on selected virulence and physiological properties of *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4742-4748, 2003.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, p. 321- 332, 2004.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 54, p. 321-332, 2004.

HAMADA, N.; SOJAR, H. T.; CHO, M.; GENCO, R. J. Isolation and characterization of a minor fimbria from *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immunol.**, v. 64, p. 4788-4794, 1996.
HAMADA, N.; TAKAHASHI, Y.; WATANABE, K.; KUMADA, H.; OISHI, Y.; UMEMOTO, T. Molecular and antigenic similarities of the fimbrial major components between *Porphyromonas gulae* and *P. gingivalis*. **Vet. Microbiol.**, v. 128, p. 108-117, 2008.

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

HAMADA, N.; WATANABE, K.; SASAKAWA, C.; YOHIKAWA, M.; YOSHIMURA, F.; UMEMOTO, T. Construction and characterization of a *fimA* mutant of *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1696-1704, 1994.

HAMPP, E. G. Vincent's infection-A wartime disease. Observations on the oral spirochetal flora present in Vincent's infection. **Am. J. Pub. Health**, v. 35, p. 441-450.

HAN, Y.W.; SHI, W.; HUANG, G.T.J.; HAAKE, S.K.; PARK, N.; KURAMITSU, H.; GENCO, R.J. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3140-3146, 2000.

HARDHAM, J.; DREIER, K.; WONG, J.; SFINTESCU, C.; EVANS, R. T. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. **Vet. Microbiol.**, v. 106, p. 119-128, 2005a.

HARDHAM, J.; REED, M.; WONG, J.; KING, K.; LAURINAT, B.; SFINTESCU, C.; EVANS, R. T. Evaluation of a monovalent companion animal periodontal disease vaccine in an experimental mouse periodontitis model. **Vaccine**, v. 23, p. 3148-3156, 2005b.

HARVEY, C. E. Periodontal disease in dogs. **Can. Dent.**, v. 28, p. 1111-1128, 1998.

HARVEY, C.E.; THORNSBERRY, C.; MILLER, BR.; SHOFER, F.S. Antimicrobial susceptibility of subgingival bacterial flora in dogs with gingivitis. **J. Vet. Dent.**, v. 12, p. 150-155, 1995.

HASHIMOTO, M.; ASAI, Y.; OGAWA, T. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. **Int. Immunol.**, v. 16, p. 1431-1437, 2004.

HECHT, D.W. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 92-97, 2004.

HENTGES, D. J. The anaerobic microflora of the human body. **Clin. Inf. Dis.**, v. 16 (suppl. 4), p. S175-80, 1993.

HIRASAWA, M.; TAKADA, K. *Porphyromonas gingivicanis* SP. Nov. and *Porphyromonas crevioricanis* sp. nov., isolated from beagles. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1994, v. 4, p. 637-640, 1994.

HOLDEMAN, L. V.; JOHNSON, J. L. Description of *Bacteroides loescheii* sp. nov. and emendation of the descriptions of *Bacteroides melaninogenicus* (Oliver and Wherry) Roy

and Kelly 1939 and *Bacteroides denticola* Shah and Collins 1981. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 32, p. 399-409, 1982.

HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE, W.E.C. **Anaerobe laboratory manual**. Virginia Polytechnic Institute. 4 ed. Blacksburg: Southern Printing Co, 1977, 172 p.

HOLDEMAN, L.V.; KELLEY, R.W.; MOORE, W.E.C. Bacteroidaceae. **In: Bergey's Manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, v. 1 , p. 602-662.

HOOVER, C. I.; FELTON JR. Correlation of haemagglutination activity with trypsin-like protease activity of *Porphyromonas gingivalis*. **Arch. Oral Biol.**, v. 37, p. 515-520, 1992.

HORWITZ, D. A.; GARRET, D. A. Use of leukocyte chemotaxis *in vitro* to assay mediators generated by immune reactions. I. Quantitation of mononuclear and polymorphonuclear leukocyte chemotaxis with polycarbonate (Nuclepore) filters. **J. Immunol.**, v. 106, p. 649-655, 1971.

HOULE, M.; GRENIER, D.; PLAMONDON, P.; NAKAYAMA, K. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to arg- gingipain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 221, p. 181- 185, 2003.

INAGAKI, S.; ONISHI, S.; KURAMITSU, H. K.; SHARMA, A. *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "*Tannerella forsythia*". **Inf. Immun.**, v. 74, p. 5023-5028, 2006.

JAVALA, J.; EEROLA, E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. Nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.49, p. 1375-1379, 1999.

JOHNSON, R. B.; WOOD, N.; SERIO, F. G. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 75, p. 37-43, 2004.

KAPATRAL, V.; ANDERSON, I.; IVANOVA, N.; REZNIK, G.; LOS, T.; LYKIDIS, A.; BHATTACHARYYA, A.; BARTMAN, A.; GARDNER, W.; GRECHKIN, G.; ZHU, L.; VASIEVA, O.; CHU, L.; KOGAN, Y.; CHAGAN, O.; GOLTSMAN, E.; BERNAL, A.; LARSEN, N.; D'SOUZA, M.; WALUNAS, T.; PUSCH, G.; HASELKORN, R.; FONSTEIN, M.; KYRPIDES, N.; OVERBEEK, R. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 2005-2018, 2002.

KARPATY, S.E.; QIN,X.Q.; GIOIA, J.; JIANG, H.; LIU, Y.; PETROSINO, J.F.; YERRAPRAGADA, S.; FOX, G.E.; HAAKE, S.K.; WEINSTOCK, G.M.; HIGHLANDER, S.K. Genome sequence of *Fusobacterium nucleatum* subspecies *polymorphum* - a genetically tractable *Fusobacterium*. **PLoS ONE**, v.2, n. 7, p. 659.

KELLY, C. D. Genus *I. castellani*, and *chalmers* **In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 7. ed. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1957, p. 424-436.

KEMPNER, M.S. Interactions of polymorphnuclear leukocytes with anaerobic bacteria. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, (Suppl. 1), p. S40-S44, 1984.

KNORR, M. Uber die fusospirillare Sysmbiose, die Gattung *Fusobacteriurn* (K. B. Lehmann) und *Spirilliurn sputigenurn*. (Zugleich ein Beitrag zur Bakteriologie der Mundhohle). II.Mitteilung: die Gattung *Fusobacterium*. . **Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.**, v. 89, p. 4-22, 1922.

KOLENBRANDER, P. E.; ANDERSEN, R.N.; MOORE, L.V.H. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3194-3203, 1989.

KRUMWIEDE, C.; PRATT, J. S. Fusiform bacilli: cultural characteristics. **J. Inf. Dis.**, v. 13, p. 438-441, 1913.

KRUSE, H. Indirect transfer of antibiotic resistance genes to man. **Acta Vet. Scand.** v. 92 , p. 59-65, 1999.

KRYSHITALSKVJ, E.; SODEK, J.; FERRIER, J. M. Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitors in gingival crevicular fluid with clinical and microscopic changfes in experimental periodontitis in the dog. **Arch. Oral Biol.**, v. 31, p. 21-31, 1986.

KUBONIWA, M.; AMANO, A.; HASHINO, E.; YAMAMOTO, Y.; INABA, H.; HAMADA, N.; NAKAYAMA, K.; TRIBBLE, G. D.; LAMONT, R. J.; SHIZUKUISHI. Distinct roles of long/short fimbriae and gingipains in homotypic biofilm development by *Porphyromonas gingivalis*. **BMC Microbiol.**, v. 9. p. 105-117, 2009.

KURAMITSU, H. K.; YONEDA, M.; MADDEN, T. Proteases and collagenases of *Porphyromonas gingivalis*. **Adv. Dent. Res.**, v. 9, p. 37-40, 1995.

LAINE, M. L.; APPELMELK, B. J.; VAN WINKELHOFF, A. J. Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. **J. Periodontol. Res.**, v. 31, p. 278-284, 1996.

LAINE, M. L.; VAN WINKELHOFF, A. J.; Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 13, p. 322-325, 1998.

LALIBERTÉ, M.; MAYRAND, D. Characterization of black-pigmented *Bacteroides* strains isolated from animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 55, p. 247-252, 1983.

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

LARSON, W. P.; BARRON, M. Report of a case in which the fusiform bacillus was isolated from the blood stream. **J. Infect. Dis.**, v. 13, p. 429-437, 1913.

LAWSON, D. A.; MEYER, T. F. Biochemical characterization of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* collagenase. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1424-1529, 1992.

LI, L.; KHANSARI, A.; SHAPIRA, L.; GRAVES, D.; SALOMON, A. Contribution of interleukine-11 and prostaglandin (s) in lipopolisaccharide-induced bone resorption in vivo. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 3915-3922, 2002.

LIJEMARK, W. F.; BLOOMQUIST, C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 7, p. 180-198, 1996.

LINDÉN, A.; LAAN, M.; ANDERSON, G.P. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. **Eur. Resp. J.**, v. 25, p. 159-162, 2005.

LISTGARTEN, M.A.; LINDHE, J.; PARODI, R. The effect of systemic antimicrobial therapy on plaque and gingivitis in dogs. **J. Periodontol. Res.**, v. 14, p. 65-75, 1979.

LOESCHE, W. J. Bacterial mediators in periodontal disease. **Clin. Inf. Dis.**, v. 16 (supp. 4), p. S203-S210, 1993.

LOVE, D. N. *Porphyromonas macacae* comb. nov. a consequence of *Bacteroides macacae* being a senior synonym of *Porphyromonas salivosa*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 90-92, 1995.

LOVE, D. N.; BAILEY, G. D.; COLLINS, S.; BRISCOE, D. A. Description of *Porphyromonas circumdentaria* sp. nov. and reassignment of *Bacteroides salivosus* (Love, Johnson, Jones and Calverley 1987) as *Porphyromonas* (Shah and Collins 1988) *salicosa* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 434-438, 1992.

LOVE, D. N.; JOHNSON, J. L.; JONES, R. F.; CALVERLEY, A. *Bacteroides salivosus* sp. nov., an asaccharolytic, black-pigmented species from cats. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 37, p. 307-309, 1987.

LOVE, D. N.; BAILEY, G. D.; COLLINGS, S.; BRISCOE, D. A. Description of *Porphyromonas circumdentaria* of *Bacteroides salivosus* (Love, Johnson, Jones, and Calverley 1987) as *Porphyromonas* (Sha and Collings 1988) *salivosa* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 434-438, 1992.

LUBBERTS, E.; KOENDERS, M.I.; VAN DEN BERG, W.B. The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. **Arthri. Res. Therapy**, v. 7, p. 29-37, 2005.

LUCAS, R. B.; THONARD, J. C. Action of oral bacteria on collagen. **J. Dent. Res.**, v. 34, p. 118-122, 1955.

MAEDA, K.; HIROFUJI, T.; CHINJU, N.; TANIGAWA, K.; IWAMOTO, Y.; HATAKEYAMA, T.; AONO, M. The modulation of polymorphonuclear leukocyte function by *Bacteroides gingivalis*. **Adv. Dent. Res.**, v. 2, p. 315-318, 1988.

MANCH-CITRON, J.N.; LOPEZ, G.D.; DEY, A.; RAPLEY, J.W.; MACNEILL, S.R.; COBB, C.M. PCR monitoring for tetracycline resistance genes in subgingival plaque following site-specific periodontal therapy: A preliminary report. **J. Clin. Periodontol.** v. 27, p. 437-446, 2000.

MANGAN, D. F.; NOVAK, M.J.; VORA, S.A.; MOURAD, J.; KRIGER, P.S. Lectinlike interactions of *Fusobacterium nucleatum* with human neutrophils. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3601-3611, 1989.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 62, p. 71-109, 1998.

MAYRAND, D.; HOLT, C. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. **Microbiol. Rev.**, 1988, v. 52, p. 134-152, 1988.

MIKKELSEN, D.; MILINOVICH, G.; BURRELL, P. C.; HUYNH, S. C.; PETTETT, L. M.; BLACKALL, L. L.; TROTT, D. J.; BIRD, P. S. Phylogenetic analysis of *Porphyromonas*

species isolated from the oral cavity of Australian marsupials. **Environm. Microbiol.**, v. 10, p. 2425-2432, 2008.

MIYASAKI, K.T. The neutrophil: Mechanisms of controlling periodontal bacteria. **J. Periodontol.**, v. 62, p. 761-774, 1991.

MÖLLER, A.J.R. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. **Odontol. Tidskr.**, v. 74, p. 276-380, 1966.

MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V. *Fusobacterium* In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**, 8. ed. Baltimore: The Williams and Wilkins, 1974, p. 384-426.

MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V. Genus I. *Bacteroides* Castellani, and Chalmers. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 8. ed. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1974, p.385-404.

MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol. 2000**, v. 5, p. 66-77, 1994.

MOUTON, C.; BOUCHARD, D.; DESLAURIERS, M.; LAMONDE, L. Immunochemical identification and preliminary characterization of a nonfimbrial hemagglutinating adhesin of *Bacteroides gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 566-573, 1989.

NAGMOTI, J. M.; PATIL, C. S.; NAGMOTI, M. B.; MUTNAL, M. B. Detection of extracellular enzymes of anaerobic gram-negative bacteria from clinically diseased and healthy sites. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 26, p. 65-67, 2008.

NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; KIMURA, R.K.; NAKAMURA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1909-1914, 2000.

NAKANO, V. **Avaliação fenotípica e genotípica de alguns fatores de virulência e de susceptibilidade a antimicrobianos de espécies do grupo *Bacteroides fragilis***. 160 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

NAVAMAR, F.; MARIAN, A.; VERWEIJ-VAN VUGHT, J.J.; MACLAREN, D.M. A study of the candidate virulence factors of *Bacteroides fragilis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 1431-1435, 1991

NISHIKATA, M.'YOSHIMURA, F. Characterization of Porphyromonas (bacteroides) gingivalis hemagglutinin as a protease. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 15, p. 336-342, 1991.

NORRIS, J. M.; LOVE, D. N. *In vitro* antimicrobial susceptibilities of three *Porphyromonas* spp. and *in vivo* responses in the oral cavity of cats to selected antimicrobial agents. **Aust. Vet. J.**, v. 78, p. 533-537, 2000.

NORRIS, J. M.; LOVE, D. Serum antibody responses of cats to soluble whole cell antigens and isolated fimbriae of feline *Porphyromonas salivosa (macacae)* and associations with periodontal disease. **Vet. Microbiol.**, v. 79, p. 225-237, 2001.

ODELL, L.J.; BAUMGARTNER, J. C.; XIA, T.; BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** v. 21 (suppl. 97), p. 77- 89, 1965.

OKAMOTO, A.C.; GAETTI-JARDIM Jr., E.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; AVILA-CAMPOS, M.J. Influence of subinhibitory concentrations of antimicrobials on hydrophobicity, adherence and ultra-structure of *Fusobacterium nucleatum*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 178-184, 2002.

OKAMOTO, M.; TAKANO, K.; MAEDA, N. Distribution of the tetracycline resistance determinant *tetQ* gene in oral isolates of black-pigmented anaerobes in Japan. **Oral Microbiol. Immun.**, v. 16, p. 224-228, 2001.

OKUDA, K.; KATO, T. Hemagglutinating activity of lipopolysaccharides from subgingival plaque bacteria. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 3192-3196, 1987.

OKUDA, K.; TAKAZOE, I. The role of *Bacteroides gingivalis* in periodontal disease. Haemagglutinating activity of *Bacteroides melaninogenicus*. **Arch Oral Biol.**, v. 19, p. 415-416, 1974.

OLIVEIRA, L.C.; LEITE, C.A.L.; BRILHANTE, R.S.N.; CARVALHO, C.B.M. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. **Can. Vet. J.**, v. 49, p. 785-788, 2008.

OLIVER, W. W.; WHERRY, W. B. Notes on some bacterial parasites of the human mucous membranes. **J. Inf. Dis.**, v. 28, p. 341-344, 1921.

OMATA, R. R.; DISRAELY, M. N. A selective medium for oral fusobacteria. **J. Bacteriol.**, v. 72, p. 677-680, 1956.

PAVLICA, Z.; PETELIN, M.; JUNTE, P.; ERZEN, D.; CROSSLEY, D.A.; SKALEVIC, U. Periodontal disease burden and pathological changes in organs of dogs. **J. Vet. Dent.**, v. 25, p. 97-105, 2008.

PÖLLÄNEN, M.T.; SALONEN, J.I. Effect of short chain fatty acids on human gingival epithelial cell keratins in vitro. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 108, p. 523-529, 2000.

POPADIAK, K.; POTEMLA, J.; RIESBECK, K.; BLOM, A.M. Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. **J. Immunol.**, v. 178, p. 7242-7250, 2007.

POTEMLA, J.; PIKE, R.N. Corruption of innate Immunity by bacterial proteases. **J. Innate Immun.**, v. 1, p. 70-87, 2009.

PRESCOTT, J.F.; HANNA, W.J.B.; REID-SMITH, R. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. **Can. Vet. J.**, v. 43, p. 107-116, 2002.

PROGULSKE-FOX, A.; TUMWASORN, S.; HOLT, S. C. The expression and function of a *Bacteroides gingivalis* hemagglutinin gene in *Escherichia coli*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 4, p. 121-131, 1989.

PROGULSKE-FOX, A.; TUMWASORN, S.; LAPINE, G.; WHITLOCK, J.; SAVETT, D.; FERRETI, J. J.; BANAS, J. A. The cloning, expression and sequence analysis of a second *Porphyromonas gingivalis* gene that codes for a protein involved in hemagglutination. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 10, p. 311-318, 1995.

RADICE, M.; MARTINO, P.A.; REITER, A.M. Evaluation of subgingival bacteria in the dog and susceptibility to commonly used antibiotics. **J. Vet. Dent.**, v. 23, p. 219-224, 2006.

RANGARAJAN, M.; ADUSE-OPOKU, J.; PARAMONOV, N.; HASHIM, A.; BOSTANCI, N.; FRASER, O. P.; TARELLI, E.; CURTIS, M. A. Identification of a second lipopolysaccharide in *Porphyromonas gingivalis* W50. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 2920-2932, 2008.

RAYAN, G. M.; DOWNARD, D.; CAHILL, S.; FLOURNOY, D. J. A comparison of human and animal mouth flora. **J. Okla State Med. Assoc.**, v. 84, p. 510-515, 1991.

REED, J.H. A Review of the experimental use of antimicrobial agents in the treatment of periodontitis and gingivitis in the dog . **Can. Vet. J.**, v. 29, p. 705-708, 1988 .

ROBERTSON, P. B.; LANTZ, M.; MARUCHA, P. T.; KORMAN, K. S.; TRUMMEL, C. L.; HOLT, S. C. Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actionobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Period. Res.**, v. 17, p. 275-283, 1982.

ROY, T. E.; KELLY, C. D. **In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 5. ed. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1939. p. 556-558.

RUBINSTEIN, I; POTEPA, J.; TRAVIS, J.; GAO, X. Mechanisms mediating *Porphyromonas gingivalis* gingipain RgpA-induced oral mucosa inflammation in vivo. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1199-1201, 2001.

RUBY, J.; BARBEAU, J. The buccale puzzle: the symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. **Can. J. Infect. Dis.**, v. 13, p. 34-41, 2002.

SAWYER, A. A.; MACDONALD, J.B.; GIBBONS, R. J. Biochemical characteristics of *Bacteroides melaninogenicus*. A study of thirty-one strains. **Arch. Oral Biol.**, v. 7, p. 685-691, 1962.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immun. Rev.**, v. 177, p. 195-203, 2000.

SCHENKEIN, H. A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. **Periodontol.** 2000, v. 40, p. 77-93, 2006.

SCHWABACHER, H.; LUCAS, D. R.; RIMINGTON, C. *Bacterium melaninogenicum*. A misnomer. **J. Gen; Microbiol.**, v. 1, p. 109-120, 1947.

SCHWARZ, S.; WANG, Z. Tetracycline resistance in *Staphylococcus intermedius*. **Lett. Appl. Microbiol.** V. 17, p. 88-91, 1993.

SHAH, H. N.; COLLINS, M. D. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.38, p. 128-131, 1988.

SHEIKHI, M.; GUSTAFSSON, A.; JARSTRAND, C. Cytokine, elastase and oxygen radical release by *Fusobacterium nucleatum* activated leukocytes: a possible pathogenic factor in periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, p. 758-762, 2000.

SHI, Y.; RATNAYAKE, D. B.; OKAMOTO, K.; ABE, N.; YAMAMOTO, K.; NAKAYAMA, K. Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, and *hagA*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 17995-17960, 1999.

SHIBATA, Y.; HAYAKAWA, M.; TAKIGUCHI, H.; SHIROKA, T.; ABIKO, Y. Determination and characterization of the hemagglutinin associated short motifs found in *Porphyromonas gingivalis* multiple gene products. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 5012-5020, 1999.

SHIBATA, Y.; HOSGI, Y.; HAYAKAWA, M.; HORI, N.; KAMADA, M.; ABIKO, Y. Construction of novel human monoclonal antibodies neutralizing *Porphyromonas gingivalis* hemagglutination activity using transgenic mice expressing human Ig loci. **Vaccine**, v. 23, p. 3850-3856, 2005.

SINGER, R.E.; BUCKNER, B.A. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. **Infect. Immun.**, v. 32, p. 458-463, 1981.

SLOTS, J.; GENCO, R. J. *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *Macacae*, a new subspecies from monkey periodontopathic indigenous microflora. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 30, p. 82-85, 1980.

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

SLOTS, J.; HAUSMANN, E. Longitudinal study of experimentally induced periodontal disease in *Macaca arctoides*: relationship between microflora and alveolar bone loss. **Infect. Immun.**, v. 23: 260-269, 1979.

SLOTS, J.; POTTS, T. V. *Fusobacterium simiae*, a new species from monkey dental plaque. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.32, p. 191-194, 1982.

SLOTS, J.; POTTS, T. V.; MASHIMO, P. A. *Fusobacterium periodonticum*, a new species from the human oral cavity. **J. Dent. Res.**, v. 62, p. 960-963, 1983.

SMALLEY, J. W.; BIRSS, A. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. The degradation of type I collagen and human plasma fibronectin by the trypsin-like enzyme and extracellular membrane vesicles of *Bacteroides gingivalis* W50. **Arch. Oral Biol.**, v. 33, p. 323-329, 1988.

SNYDERMAN, B.R.; GEWURZ, H.; MERGENI-IAGEN, S.E. Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide generation of a factor chemotactic for polymorphonuclear leukocytes. **J. Exp. Med.**, v. 128, p. 259-275, 1968.

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

SORUM, H.; SUNDE, M. Resistance of antibiotics in the normal flora of animals. **Vet. Res.**, v. 32, p. 227-241, 2001.

SPAULDING, E. H.; RETTGER, L. F. The *Fusobacterium* genus II. Some observations on growth requirements and variation. **J. Bacteriol.**, v.34, p. 535-548, 1937.

SUNDQVIST, G. Pathogenicity and virulence of black-pigmented Gram-negative anaerobes. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 6, p. 125-138, 1993.

SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, G. Neutrophils chemotaxis induced by anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 88, p. 113-121, 1980.

SVEEN, K. Rabbit polymorphonuclear leukocyte migration *in vitro* in response to lipopolysaccharide from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Veillonella*. **Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B**, v. 85, p. 374-380, 1977.

SYED, S. A.; SVANBERG, M.; SVANBERG, G. The predominant cultivable dental plaque flora of beagle dogs with periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 8, p. 45-56, 1981.

TAKAHASHI, K.; AZUMA, T.; MOTOHIRA, H.; KINANE, D.F.; KITETSU, S. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p.369-374, 2005.

TAKAHASHI, N.; KATO, T.; KURAMITSU, H. K. Isolation and preliminary characterization of the *Porphyromonas gingivalis* gene expressing collagenase activity. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 84, p. 135-138, 1991.

TALAN, D. A.; CITRON, D. M.; ABRAHAMIAN, F. M.; MORAN, G. F.; GOLDSTEIN, E. J. C. Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 85-92, 1999.

TAYLOR, D.E.; CHAU, A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. **Antim. Agent. Chemother.**, v. 40, p. 1-5, 1996.

TAYLOR, P.W. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram-negative bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 47, p. 46-83, 1983.

TUNNICLIFF, R. Further studies on fusiform bacilli and spirilla. **J. Inf. Dis.**, v.8, p. 316-321, 1911.

TUNNICLIFF, R. The identity of fusiform bacilli and spirilla. **J. Inf. Dis.**, v. 3, p. 148-155, 1906.

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.**, v. 74, p. 119-122, 2003.

VAN DIKE, T.E. Neutrophil receptor modulation in the pathogenesis of periodontal diseases. **J. Dent. Res.**, v. 63, p. 452-454, 1984.

VAN DYKE, BARTHOLOMEW, E.; GENCO, R. J.; SLOTS, J.; LEVINE, M. J. Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. **J. Periodontol.**, v. 53, p. 502-508, 1982.

VAN WINKELHOFF, A. J.; APPELMELK, B. J.; KIPPUW, N.; DE GRAAFF, J. K. K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 8, p. 259-265, 1993.

VARNEY, P. L. The serological classification of fusiform bacilli. **J. Bacteriol.**, v. 13, p. 275-314, 1927.

VEL, W.A.C.; NAVAMAR, F.; MARIAN, A.; VERWEIJ-VAN VUGHT, J.J.; PUBBEN, A.N.B.; MACLAREN, D.M. Haemagglutination by *Bacteroides fragilis* group. **J. Med. Microbiol.**, v. 21, p. 105-107, 1986.

VERNAL, R.; DUTZAN, N.; CHAPARRO, A.; VALENZUELA, M.A.; GAMONAL, J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p. 383-389, 2005.

VINCENT, J.W.; FALKLER Jr., W.A.; CRAIG, J.A. Comparison of serological reactions of typed *Fusobacterium nucleatum* strains with those of isolates from humans, canines, and *Macaca mulatta* monkey. **J. Microbiol. Immunol.**, v.17, p. 631-635, 1983.

WARD, P.A.; COCHRANE, C.G.; MÜLLER-EBEHARD, H.J. The role of serum complement in chemotaxis of leukocytes in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 122, p.327-346, 1965.

WARD, P.A.; LEPOW, H.; NEWMAN, L.J. Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leukocytes. **Am. J. Pathol.**, v. 52, p. 725-736, 1968.

WATSON, A. D. J. Diet and periodontal disease in dogs and cats. **Aust. Vet. J.**, v. 71, p. 313-318, 1994.

WEAVER, G. H.; TUNNICLIFF, R. The occurrence of fusiform bacilli and spirilla in connection with morbid processes. **J. Infect. Dis.**, v. 2, p. 446-459, 1905.

WEGENER, H.C.; AARESTRUP, F.M.; GERNER-SMIDT, P. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. **Acta Vet. Scand.** v.92, p. 51-55, 1999.

WERNER, H.; NEUHAUS, F.; HUSSELS, H. A biochemical study of fusiform anaerobes. **Med Microbiol. Immunol.**, v. 157, p. 10-16, 1971.

WILLEMS, A.; COLLINS, M.D. Reclassification of *Oribaculum catoniae* (Moore and Moore 1994) as *Porphyromonas catoniae* comb. nov. and emendation of the genus *Porphyromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 45, p. 578-581, 1995.

WITTSTOCK, M.; SCHIMIDT, H.; FLEMMING, T. F.; KARCH, H. Heterogeneity of the *prtC* gene of *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, p. 33-39, 2000.

XIE, H.; CHUNG, W. O.; PARK, Y.; LAMONT, R. Regulation of the *Porphyromonas gingivalis* *fimA* (fimbriillin) gene. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6574-6579, 2000.

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

YAN-MIN, W. U.; YAN, J.; CHEN, L. L.; GU, Z. Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. **J. Zhejiang Univ. Sci. B**, v. 8, p. 121-131, 2007.

YONEZAWA, H.; ISHIHARA, K.; OKUDA, K. Arg-Gingipain a DNA vaccine induces protective immunity against infection by *Porphyromonas gingivalis* in a murine model. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 2858-2864, 2001.

YOSHIMURA, A.; HARA, Y.; KANEKO, T.; KATO, I. Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. **J. Periodontol. Res.**, v. 3, p. 279-286, 1997.

YOSHIMURA, F.; TAKAHASHI, K.; NODASAKA; SUZUKI, T. Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingival*. **J. Bacteriol.**, v. 160, p. 949-957, 1984.

YÜCEL Ö. Ö.; BERKER, E.; GARIBOGLU, S.; OTLU, H. Interleukin-11, interleukin-1b, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p. 365-370, 2008.

ZILM, P.S.; BAGLEY, C.J.; ROGERS, A.H.; MILNE, I.R.; GULLY, N.J. The proteomic profile of *Fusobacterium nucleatum* is regulated by growth pH. **Microbiol.**, v. 13, p. 148-159, 2007.