Sílvia Regina Loureiro Teixeira

"Análise da variabilidade de sistema de regulação de dois componentes FimSR e expressão do operon *fimA* em *Porphyromonas gingivalis*"

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

São Paulo
2013

Sílvia Regina Loureiro Teixeira

"**Análise da variabilidade de sistema de regulação de dois componentes FimSR e expressão do operon *fimA* em *Porphyromonas gingivalis*"**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Teixeira, Sílvia Regina Loureiro.
Análise da variabilidade de sistema de regulação de dois componentes FimSR e expressão do operon *fimA* em *Porphyromonas gingivalis* / Sílvia Regina Loureiro Teixeira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer.

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

Versão do título para o inglês: Variability of the two components system FimSR and expression of *fimA* in *Porphyromonas gingivalis*.

1. Microbiologia oral 2. *Porphyromonas gingivalis* 3. Expressão gênica I. Mayer, Profa. Dra. Marcia Pinto Alves II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB03/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sílvia Regina Loureiro Teixeira.

Título da Tese: Análise da variabilidade de sistema de regulação de dois componentes FimSR e expressão do operon *fimA* em *Porphyromonas gingivalis*.

Orientador(a): Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer.

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

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091 7733 - telefax: (55) (011) 3091 8405

Decl. CEPSH. 100.2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer PARECER 846/CEP-10.07.08, informo que o titulo do Projeto foi alterado para *"Análise da variabilidade do operon fimA em Porphyromonas gingivalis e expressão gênica"* não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 14 de outubro de 2010.

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **016** nas fls. **83** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Márcia Pinto Alves Mayer, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Análise da expressão de fimbria e cápsula em amostras de Porphyromonas gingivalis** do qual participou(aram) o(s) alunos **Silvia Regina Loureiro Teixeira, Talyta Thereza Soares D`Epiro e os pesquisadores Maria Regina Simionato, Marinilce Fagundes dos Santos ,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **11.03.2010,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 12 de março de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

Aos meus pais Fernando e Ana Maria por tudo o que me ensinaram e ao meu marido Eduardo por todo o apoio e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Marcia, a quem tenho muita admiração, pela amizade e por tudo que me ensinou.

Aos grandes amigos que fiz no laboratório durante todo meu doutorado: Adriana, Bruno, Carol, Cíntia, Dione, Ellen, Estela, Éricka, Flávia, Gláucia, Josely, Karin, Liliane, Livia, Lucas, Luciana, M.Cristina, Maike, Marcela, Pâmela, Priscila e Talyta.

Ao pessoal do Forsyth Institute que me acolheram tão bem durante os 3 meses que estive em Boston: Profa. Margaret Duncan, Heike Boisvert, Ana Piñedo, Karthik Krishnan.

Ao Jonas José Kisielius, diretor responsável pelo setor de microscopia eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, uma pessoa muito inteligente e prestativa que ensinou tudo que sei de microscopia e sem a qual não seria possível realizar as análises microscópicas.

A Profa. Maria Regina Lorenzetti Simionato e seus alunos: Andréa, Daniela, Graziela, Luciana e Paulo, pela ajuda e por me emprestarem a câmara de anaerobiose enquanto a nossa esteve quebrada, sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido terminar meu trabalho a tempo.

Aos técnicos João Paulo e Léo por toda a ajuda no laboratório.

As secretárias do ICB: Alice, Naíde, Bete e Gisele pela ajuda de sempre.

Ao Prof. Jorge Timenetsky e sua técnica Celminha por terem cedido um espaço para a utilização do aparelho possibilitando a realização das reações de PFGE.

A minha família por todo apoio.

E finalmente aos meus dois anjinhos que acompanharam essa fase final bem de pertinho.

O meu sincero agradecimento !

Este trabalho foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) processos número: 2009/50191-1 e 2009/53958-1

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.” (Isaac Newton)

RESUMO

TEIXEIRA, S. R. L. **Análise da variabilidade de sistema de regulação de dois componentes FimSR e expressão do operon *fimA* em *Porphyromonas gingivalis.*** 2013. 94 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As fímbrias são consideradas estruturas fundamentais para a colonização da cavidade oral *por Porphyromonas gingivalis*, pois estão envolvidas na interação com células epiteliais e outros substratos. No entanto, certas amostras desta espécie, consideradas altamente virulentas em modelos animais, são encapsuladas e não expressam a fímbria principal nas condições estudadas. A transcrição do operon *fimA* é regulada pelo sistema de dois componentes FimSR, mas pouco se sabe sobre a regulação de *fimA* em isolados clínicos de *P. gingivalis.* Objetivo: testar a hipótese de que as variações na região promotora de *fimSR* e / ou diferenças na transcrição de *fimS* e *fimR* poderiam influenciar a transcrição de *fimA,* a expressão de FimA e a capacidade de adesão a células epiteliais por diferentes cepas de *P. gingivalis*. Além disso, os efeitos de interação com as células epiteliais e outras alterações ambientais sobre a transcrição de *fimA* foram avaliados. Métodos: 21 cepas clínicos de *P. gingivalis* e as cepas de referência 33277 (fimbriada, *fimA* genótipo I, não capsulada) e W83 (não fimbriada, *fimA* genótipo IV, capsulada) foram avaliados. A cápsula foi detectada por microscopia óptica após coloração negativa e a presença e morfologia das fímbrias foi determinada por MET. A proteína FimA foi detectada por Western-Blot. A fim de caracterizar a população estudada e determinar se a expressão de fímbrias estaria relacionada a uma certa linhagem, perfis de macrorestrição por PFGE e o genótipo *fimA* foram determinados. As sequências da região *fimSR e do gene pg2130* foram determinadas. Estes dados foram correlacionados com a transcrição relativa dos genes *fimS, fimR* e *fimA* sob cultivo *in vitro* e após interação com células epiteliais gengivais OBA-9. OBA-9 foram co-cultivadas com amostras de *P. gingivalis* e a capacidade de adesão a células epiteliais foi determinada pela contagem de viáveis. Resultados: A presença de cápsula foi determinada em 13 de 21 amostras clínicas. A análise por MET revelou que 14 de 21 amostras clínicas apresentavam fímbrias longas, características de FimA. Foi detectada a proteína FimA por Western Blot nas cepas classificadas como fimbriadas pela análise por MET. Não houve correlação entre os genótipos *fimA* ou a presença de fímbrias e/ou cápsula e perfis de macrorestrição determinados por PFGE. Níveis de transcrição de *fimA* equivalentes à cepa fimbriada 33277 foram detectados em 3 de 14 cepas fimbriadas, e em 2 de 7 não-fimbriadas. Diferenças na transcrição de *fimA* não podem ser atribuídas a diferenças na região promotora de *fimSR*. *fimA* foi regulado positivamente após interação com células epiteliais na maioria das cepas fimbriadas e não-fimbriadas. No entanto, não houve correlação entre a transcrição de *fimA* e dos genes codificando o sistema de dois componentes *fimSR*. Todas as cepas foram capazes de aderir às células eucarióticas (eficiência de 1,2 a 6,1%). Conclusões: Os dados indicam que a regulação de *fimA* é cepa específica. Cepas não-fimbriadas podem apresentar outras estratégias para aderir às células epiteliais, sugerindo que, além das fímbrias, outras estruturas poderiam desempenhar um papel na interação dessa espécie com as células epiteliais.

Palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis*. Fímbrias. Expressão gênica.

ABSTRACT

TEIXEIRA, S. R. L. **Variability of the two components system FimS FimR and expression of *fimA* in *Porphyromonas gingivalis.*** 2013. 94 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The fimbriae are considered a key structure for colonization of the oral cavity *by Porphyromonas gingivalis*, since it is involved in the interaction with epithelial cells and other substrates. However, some strains considered highly virulent in animal models are capsulated and do not express the fimbriae under the studied conditions. The transcription of the *fimA* operon is regulated by the two components system FimSR, but little is known on the regulation of *fimA* in clinical isolates of *P. gingivalis*. Objective: to test the hypothesis that variations in the promoter region of *fimSR* and /or differences in the expression of *fimS* and *fimR* would influence the transcription of *fimA* and the ability to adhre to epithelial cells by different strains of *P. gingivalis*. In addition, the effects of interaction with epithelial cells and other environmental changes on the transcription of *fimA* were evaluated. Methods: 21 clinical strains of *P. gingivalis* and reference strains 33277 (fimbriated, *fimA* genotype I, noncapsulated) and W83 (non fimbriated, *fimA* genotype IV, capsulated) were evaluated. Capsule was detected by optical microscopy after negative staining, and fimbriae presence and morphology determined by TEM. The FimA protein was detected by Western blot. In order to characterize the studied population and determine whether fimbriae expression is related to a certain lineage, macrorestriction profiles by PFGE and genotype *fimA* were determined. The sequences of the promoter region of *fimSR* were determined. These data were correlated with the relative transcription of genes *fimS, fimR* and *fimA* under *in vitro* cultivation and after interaction with gingival epithelial cells OBA-9 (GECs). OBA-9 cells were co-cultivated with *P. gingivalis* isolates and percent of adherent cells determined by viable counts. Results: The presence of capsule was determined in 13 of 21 clinical samples. MET analysis revealed that 14 of 21 clinical strains showed long fimbriae, characteristics of FimA. The protein FimA was detected by Western blot in strains classified as fimbriated by TEM analysis. There was no correlation between genotypes *fimA* or the presence of fimbriae and / or capsule and macrorestriction profiles determined by PFGE. FimA transcription levels equivalent to fimbriated strain 33277 were detected in 3 of 14 fimbriated strains, and 2 of 7 non-fimbriated. Differences in *fimA* transcription can not be attributed to differences in fimSR promoter region. *fimA* was upregulated after interaction with epithelial cells in most fimbriated and non-fimbriated strains. However, there was no correlation between the transcriptional and *fimA* genes encoding the two component system *fimSR*. All strains were able to adhere to eukaryotic cells (efficiency from 1.2 to 6.1%). Conclusions: Regulation of *fimA* seems to be strain specific. Non-fimbriated strains may have other strategies to adhere to epithelial cells, suggesting that in addition to fimbriae, other structures could be involved in the interaction of this species with epithelial cells.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*. Fimbriae. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cascata de regulação da expressão do gene *fimA*..... 27
Figura 2 - Esquema mostrando que a região a montante do gene *fimS* difere entre as cepas 33277 e W83, pela possível inserção de um fragmento de 385.209pb no cromossomo de W83..... 35
Figura 3 - Esquema representando a localização dos iniciadores utilizados para amplificação da região *fimSR* de *P. gingivalis* e o tamanho dos amplicons esperados utilizando como molde DNA da cepa 33277. As sequências dos iniciadores utilizados estão apresentadas na Tabela 1..... 37
Figura 4 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de FimA de diferentes genótipos *fimA*..... 44
Figura 5 - Fotomicrografias eletrônicas de células de *P. gingivalis* fimbriadas, coradas com fosfotungstato de potássio a 2%..... 47
Figura 6 - Fotomicrografia eletrônica de células da cepa *P. gingivalis* W83, não fimbriada, corada com vermelho de rutênio. 48
Figura 7 - Fotomicrografia de células de *P. gingivalis* W83 após coloração de Hiss, observadas sob microscópio óptico de campo claro. Aumento 1000X. O halo branco ao redor da célula bacteriana é indicativo da presença de cápsula..... 49
Figura 8 - Perfil de macrorestrição do DNA de amostras de *P. gingivalis* digeridas com *NotI*.. 51
Figura 9 - Dendrograma representando a similaridade de 16 cepas de *P. gingivalis* determinados por análise de restrição *Not I*. Os genótipos *fimA*, a similaridade da região promotora de *fimS* com a amostra 33277 ou W83 (33277-*like* e W83-*like*, respectivamente) e a detecção de cápsula e fímbria foram incluídos para comparação..... 52
Figura 10 - Dendrograma baseado no coeficiente de similaridade DICE construído através do algorítimo UPGMA, mostrando o padrão de similaridade de 25 cepas de *P. gingivalis.* Os dados foram comparados ao genótipo *fimA*, a similaridade da região promotora de *fimS* e a detecção de cápsula e fímbria..... 53
Figura 11 - Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio onde os produtos de amplificação relativos a região promotora do gene *fimS* homóloga a W83, foram submetidos a corrida eletroforética em tampão TAE..... 54

Figura 12 - Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio onde os amplicons (573pb) relativos a região promotora do gene fimS homóloga a 33277 foram submetidos a corrida eletroforética em tampão TAE..... 55
Figura 13 - Alinhamento das sequências da região promotora do gene *fimS* das cepas que amplificaram com os iniciadores para W83. A região sugestiva de -10, o códon de iniciação de transcrição estão destacados nas caixas e os dados referentes ao genótipo *fimA* e presença da cápsula e fímbria estão apresentados..... 56
Figura 14 - Alinhamento das sequências da região promotora do gene *fimS* das cepas que amplificaram com os iniciadores para 33277. A região sugestiva de -10, o códon de iniciação de transcrição estão destacados nas caixas e os dados referentes ao genótipo *fimA* e presença da cápsula e fímbria estão apresentados..... 57
Figura 15 - Fotografia de um gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Amplicons foram submetidos a eletroforese em tampão TAE..... 58
Figura 16 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da região do gene *fimR.* As regiões coloridas correspondem ao polimorfismo em FimR, e os seus correspondentes em *fim*R são mostrados na figura 17..... 59
Figura 17 - Domínios conservados de FimR. As regiões polimórficas entre as cepas de *P. gingivalis* estão mostradas em quadrados coloridos, cujas cores correspondem às regiões mostradas na figura 16..... 59
Figura 18 - Região codificadora do domínio quinase de *fimS*..... 60
Figura 19 - Alinhamento das sequências da região onde há a inserção de uma adenina na cepa W83..... 60
Figura 20 - Alinhamento das sequências do gene *pg2130* das cepas de *P. gingivalis*..... 61
Figura 21 - Níveis de transcrição dos genes *fimA, fimS* e *fimR* observados em 33277 e W83 sob diferentes condições ambientais em relação à condição controle (TSBHK a 37°C). *p<0.05. ***p<0.001 (ANOVA, Tukey)..... 63
Figura 22 - Transcrição relativa de *fimA, fimS* e *fimR* nas condições controle (coluna clara) e após contato com a célula epitelial (coluna escura) com MOI 1:300 e 1:3000..... 64

Figura 23 - Eficiência de adesão de cepas de *P. gingivalis* à célula epitelial (média e desvio padrão de um ensaio em triplicata em três experimentos independentes)..... 65
Figura 24 - Foto ilustrativa do filme radiográfico onde foi detectada a presença do monômero de FimA utilizando o anticorpo anti-fimA IV em lisados de amostras *de P. gingivalis*..... 70
Figura 25 - Foto ilustrativa do filme radiográfico onde foi detectada a presença do monômero de FimA utilizando o anticorpo anti-fimA I..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação da região fimSR..... 36

Tabela 2 - Número de cepas de P. gingivalis em relação à presença de fímbria, detectada por microscopia eletrônica, e de cápsula, detectada por microscopia óptica. Os dados sobre as cepas W83 e ATCC 33277 foram anotados isoladamente, pois estas amostras têm o seu fenótipo conhecido e foram usadas como controle..... 50

Tabela 3 - Valores de média e desvio padrão da porcentagem de adesão à célula epitelial de amostras de P. gingivalis fimbriadas e não fimbriadas..... 66

Tabela 4 - Eficiência de adesão (%), genótipo fimA e transcrição relativa de fimA, fimS e fimR na condição controle e após interação com célula epitelial (dados em relação a transcrição em 33277 na condição controle), em cepas de P. gingivalis classificadas como fimbriadas. 68

Tabela 5 - Eficiência de adesão (%), genótipo fimA e transcrição relativa de fimA, fimS e fimR na condição controle e após interação com célula epitelial (dados em relação a transcrição em 33277 na condição controle), em cepas de P. gingivalis classificadas como não fimbriadas. 69

Tabela 6 - Amostras analisadas quanto à presença da proteína FimA por Western-Blot e presença de fímbrias por MET..... 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg - micrograma

µl - microlitro

ATCC- American Type Collection

cDNA - DNA complementar

CO2 - dióxido de carbono

CT - ciclo Threshold

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfato

DO - densidade óptica

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ensaio imunoenzimático)

g - gravidade

g - grama

h - horas

kDa - kilodalton

LPS - lipopolissacarídeo

M - molar

mg - miligrama

$MgCl_2$- cloreto de magnésio

min - minuto

ml - mililitro

MLST- multilocus sequence typing (tipagem por seqüenciamento de multilocus)

mm - milímetro

mM - milimolar

mM - milimolar

MOI - multiplicidade de infecção

n - número

ng - nanograma

nm - nanômetro

NT - amostra não tipável

OBA-9 - linhagem de células epiteliais gengivais

pb - pares de base

PBS - solução salina tamponada fosfatada

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PFGE - *pulsed-field gel eletrophoresis* (eletroforese em campo pulsado)

pH - potencial hidrogeniônico

PM - peso molecular

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa

RAPD - Análise de DNA polimórfico amplificado randomicamente

rpm - rotações por minuto

RNA - ácido ribonucléico

RT- PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

s - segundos

TAE - Tris acetato EDTA

TE - Tris EDTA

TSBHM - Caldo Triptone Soja suplementado com hemina e menadione

UFC - unidades formadoras de colônias

UV - ultra violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 21
2 OBJETIVOS..... 29
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 30
3.1 Cepas Bacterianas e condições de cultura..... 30
3.2 Detecção de fímbria e cápsula por Microscopia Eletrônica de Transmissão..... 30
3.*2.1 Detecção de fímbria*..... 30
3.2.2 Detecção de cápsula..... 31
3.3 Detecção de cápsula por microscopia óptica..... 31
3.4 Tipagem usando Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)..... 32
3.4.1 Preparação do plug..... 32
3.4.2 Digestão dos plugs e Corrida eletroforética..... 32
3.4.3 Interpretação dos resultados obtidos por PFGE..... 33
3.5 Análise do polimorfismo das regiões *fimSR* e de *pg 2130*..... 33
3.5.1 Condições gerais..... 33
3.5.2 Detecção de fimR..... 34
3.5.3 Análise do polimorfismo da região promotora de fimS..... 35
3.5.4 Análise da sequência da região fimS/fimR..... 36
3.5.5 Análise da sequência da região promotora do gene pg 2130..... 37
3.6 Interação de cepas de *P. gingivalis* a células epiteliais gengivais..... 37
3.6.1 Células epiteliais e condições de cultivo..... 38
3.6.2 Ensaio de adesão..... 39
3.6.3 Eficiência de adesão de P. gingivalis à célula epitelial..... 39
3.6.4 Transcrição de fimA, fimS e fimR..... 40
3.6.5 Transcrição relativa de fimA, fimS e fimR após interação com a célula epitelial..... 40
3.6.6 Extração de RNA e síntese de cDNA..... 41
3.6.7 Análise da transcrição relativa..... 41

3.7 Análise da transcrição de *fimA, fimS e fimR* após desenvolvimento em meio líquido..... 42
3.7.1 Análise da Transcrição relativa de fimA, fimS e fimR em diferentes condições ambientais..... 42
3.8. Detecção da proteína da fímbria..... 43
3.8.1 Desenvolvimento de anticorpos policlonais contra peptideos sintéticos FimA..... 43
3.8.2 Western-blot..... 44
4 RESULTADOS..... 46
4.1 Detecção de fímbria e cápsula através de Microscopia Eletrônica de Transmissão..... 46
4.2 Detecção de cápsula por microscopia óptica..... 48
4.3 Análise do Perfil de Macrorrestrição Após Eletroforese Em Campo Pulsado (PFGE)..... 50
4.4 Análise da seqüência da região *fimS* / *fimR*..... 53
4.4.1 Detecção de fimR por amplificação..... 53
4.4.2 Análise do polimorfismo da região promotora de fimS..... 54
4.4.3 Análise da sequência da região fimS/fimR 57
4.4.4 Análise da sequência da região promotora do gene pg 2130..... 60
4.5 Transcrição relativa de *fimA, fimS* e *fimR* em diferentes condições ambientais..... 61
4.6 Ensaio de Adesão a células epiteliais - efeito da Multiplicidade de Infecção (MOI) sobre a transcrição gênica..... 64
4.7 Ensaio de adesão..... 65
4.8 Transcrição relativa de *fimA, fimS* e *fimR* após interação com células epiteliais..... 66
4.9 Western Blot..... 69
5 DISCUSSÃO..... 72
6 CONCLUSÕES..... 81
REFERÊNCIAS..... 82
APÊNDICE A - Características das cepas utilizadas no presente estudo..... 90
APÊNDICE B - Fotomicrografias da superfície externa das células de *P. gingivalis* através de visualização por MET..... 91

1 INTRODUÇÃO

Periodontite é uma condição caracterizada pela destruição dos tecidos que suportam o elemento dentário, incluindo o osso alveolar e os ligamentos periodontais. Doenças periodontais resultam de complexas interações entre as bactérias patogênicas do biofilme subgengival e os tecidos do hospedeiro (ADUSE-OPOKU et al., 2006; HOLT; EBERSOLE, 2005; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

Embora mais de 700 espécies bacterianas possam colonizar a cavidade oral (AAS et al., 2005), apenas algumas delas estão relacionadas com a doença (PASTER et al., 2006).

As bactérias do biofilme subgengival co-habitam em complexos (SOCRANSKY; HAFFAJEE; DZINK, 1998). Foram descritos 5 complexos bacterianos principais no ambiente subgengival, de acordo com a relação entre as diferentes espécies, denominados complexos vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo. O complexo vermelho foi fortemente relacionado à periodontite crônica avançada e é composto pelas bactérias *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. *P. gingivalis* está presente, em altos níveis, em sítios com sangramento à sondagem e supuração (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2005; SLOTS, 1999; SOCRANSKY et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2009), além de ser detectada em mais de 85% dos sítios doentes (YANG; HUANG; CHOU, 2004).

P. gingivalis, juntamente com *T. denticola* e *T. forsythia* são considerados colonizadores tardios do biofilme subgengival, colonizando principalmente a região próxima ao epitélio interno da bolsa periodontal. Estas espécies dependem da colonização prévia do biofilme por micro-organismos pioneiros, e de colonizadores intermediários, como *Fusobacterium nucleatum* e *Micromonas micros* (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

P. gingivalis é um cocobacilo, assacarolítico, Gram-negativo, que requer condição de anaerobiose para seu crescimento. Apresenta morfologia colonial característica em ágar sangue, com colônias inicialmente variando entre branco ou creme e que escurecem após 4 a 8 dias de incubação devido à deposição de hemina sobre a superfície celular bacteriana (SMALLEY et al., 2006). A hemina é utilizada em estudos *in vitro* como fonte de aquisição de ferro por *P. gingivalis*, sendo o ferro elemento crucial para o crescimento e determinação de virulência desta bactéria (KUBONIWA et al., 2001).

P. gingivalis adquire sua energia metabólica através da fermentação de aminoácidos, uma propriedade decisiva para a sua sobrevivência em bolsas periodontais, onde os açúcares são extremamente escassos (BOSTANCI; BELIBASAKIS 2012).

A infecção da cavidade oral por *P. gingivalis* pode estar associada com condições sistêmicas como doenças cardiovasculares e aumento do risco de partos prematuros (Mealey; Rose, 2008; Offenbacher et al., 2006). Além disso, a infecção por *P. gingivalis* pode desempenhar um papel fundamental na perda precoce de tolerância para auto-antígenos na patogênese da artrite reumatóide (MIKULS et al., 2012).

Este patógeno oportunista pode invadir células não fagocíticas e se multiplicar no citoplasma, e sua sobrevivência no interior da célula poderia estar associada à manutenção da cronicidade da lesão periodontal (LAMONT et al., 1995; MAO et al., 2007; PARK et al., 2004). Estudos *in vitro* mostraram que *P. gingivalis* pode induzir a apoptose de fibroblastos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais da gengiva (ROTH et al., 2007). Entretanto, existem estudos que relatam que *P. gingivalis* internalizadas são capazes de inibir o processo apoptótico induzido pelo micro-organismo, prolongando assim a sobrevivência no interior das células do hospedeiro (BOISVERT; DUNCAN, 2010; YILMAZ; WATANABE; LAMONT, 2002; YILMAZ et al., 2004; ZARIC et al., 2010). Os resultados discrepantes entre estudos sugerem que quando a relação bactérias / células epiteliais é baixa e o tempo de exposição é curto, ocorre invasão bacteriana, o que resulta em inibição do processo apoptótico, permitindo a multiplicação da bactéria no interior do citoplasma. Por outro lado, quando a quantidade de bactérias e o tempo de exposição aumentam, pode ocorrer a apoptose, resultando em destruição periodontal (STATHOPOULOU et al., 2009).

P. gingivalis apresenta um grande número de fatores de virulência que incluem o lipopolissacarídeo (LPS), polissacarídeo capsular, fímbrias, hemaglutinina e enzimas proteolíticas extracelulares, propiciando a adesão aos tecidos orais, formação de biofilme, indução do quadro inflamatório, obtenção de nutrientes e evasão das defesas do hospedeiro (YOSHIMURA et al., 2009).

As fímbrias desempenham um fator crítico por mediarem a interação entre a bactéria e as células do hospedeiro (DUNCAN; NAKAO; XIE, 1993; LAMONT; JENKINSON, 2000) e componentes salivares, superfícies duras, proteinas da matriz

extracelular e bactérias comensais (AMANO, 2007; HAMADA et al., 1996; LAMONT; JENKINSON, 2000).

Um papel particular das fímbrias é revelado na indução da destruição óssea em modelos experimentais de periodontite. A infecção em ratos com cepas não fimbriadas de *P. gingivalis* resultou em menor perda óssea periodontal, quando comparado com a infecção com cepas fimbriadas (JOTWANI; CUTLER, 2004). Além disso, a imunização contra a fímbria de *P. gingivalis* protegeu contra a perda óssea em ratos gnotobióticos (MALEK et al., 1994; SHARMA et al., 2001). Estudo recente, porém, demonstrou que *P. gingivalis* não é capaz por si só de induzir a perda óssea, mas sua presença altera a composição da microbiota comensal que passa a induzir a perda óssea (DARVEAU; HAJISHENGALLIS; CURTIS 2012).

P. gingivalis possui dois tipos diferentes de fímbrias classificadas com base no tamanho e antigenicidade. As subunidades das fímbrias denominadas principais ou longas são codificadas pelo gene *fimA* e tem peso molecular de aproximadamente 40 kDa (FimA). As fímbrias curtas tem subunidades com peso molecular de 67 kDa (Mfa1) e são codificadas pelo gene *mfa1* (AMANO et al., 2000; AMANO et al., 2004; LAMONT; JENKINSON, 2000;).

As fímbrias principais ligam-se a proteínas eucarióticas, particularmente a integrina α5β1 (TSUDA et al., 2008), fibronectina e colágeno tipo I, além de proteínas procarióticas, especialmente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Streptococcus oralis* (MAEDA et al., 2004). As proteínas acessórias, FimC e FimD, parecem desempenhar um papel crucial na adesão e estão provavelmente localizadas na ponta dos filamentos como um complexo de adesão (NISHIYAMA et al., 2007). Estudos sugeriram que a associação do receptor da integrina α5β1 com a membrana da célula poderia mediar a ativação do citoesqueleto de actina, permitindo assim a entrada de *P. gingivalis* nas células hospedeiras (NAKAGAWA et al., 2002; TSUDA et al., 2008). As fímbrias permitem às células de *P. gingivalis* explorar o receptor *Toll-like* 2 como via de sinalização de invasão intracelular, inibição da expressão de IL-12p70 e persistência em macrófagos (WANG et al., 2007).

O gene *fimA* ocorre como uma cópia simples no cromossomo de *P. gingivalis* (NELSON et al., 2003) e é classificado em seis tipos (genótipos I, Ib, II, III, IV e V) com base na sequência nucleotídica (AMANO et al., 1999). Estudos analisando a prevalência dos diferentes genótipos *fimA* em indivíduos com

periodontite crônica demonstraram que o genótipo *fimA* II é o mais prevalente entre pacientes com periodontite (AMANO et al., 2004; EICK et al., 2002; MISSAILIDIS et al., 2004), inclusive no Brasil, seguido pelo tipo Ib (MISSAILIDIS et al., 2004). Também em lesões periapicais o genótipo *fimA* se distingue, sendo que os genótipos *fimA* II, IV e Ib estão relacionados à etiologia de doenças perirradiculares sintomáticas enquanto o genótipo I foi mais prevalente em periodontites apicais assintomáticas, sugerindo um importante papel das fímbrias também na periodontite apical (WANG et al., 2010).

Em estudo através de PCR em tempo real analisando amostras subgengivais de pacientes fumantes com periodontite crônica, verificamos que o genótipo *fimA* IV foi mais prevalente que *fimA* II, e que os níveis de *fimA* IV se relacionavam à profundidade da bolsa periodontal (TEIXEIRA et al., 2009). Apesar da alta prevalência do genótipo *fimA* II em periodontite, outro estudo também havia demonstrado por análise heteroduplex da região intergênica rRNA (ISR), uma associação entre cepas de *P. gingivalis* com genótipo correspondente a *fimA* IV, denominadas como “W83-*like* strains” e a severidade da periodontite (GRIFFEN et al., 1999).

O método de genotipagem baseado em *fimA*, entretanto, deve ser reavaliado devido a existência de amostras não tipáveis e amostras classificadas em mais de um tipo (ENERSEN et al., 2008; MISSAILIDIS et al., 2004). Além disso, a determinação do tipo Ib é dificultada, pois o gene *fimA* Ib apresenta homologia aos iniciadores utilizados para identificação dos tipos I e II, mas o produto de amplificação tem sequência distinta, demonstrada por análise de restrição (AMANO et al., 1999; ENERSEN et al., 2008).

Embora apresentem o gene *fimA* no genoma, extratos celulares de algumas cepas de *P. gingivalis,* como a cepa W83, não reagem a anticorpos anti-FimA, sugerindo que essa cepa não expressa a fímbria (LEE et al., 1991; SUZUKI et al., 1988). A expressão da fímbria nessas cepas poderia ser regulada por condições ambientais, mas a ausência de expressão da fímbria pela cepa W83 pode também ser observada em ensaio *in vivo*, após a inoculação da bactéria em câmera inserida no subcutâneo de ratos (YOSHIMURA et al., 2008).

As cepas ATCC33277 e 381, que apresentam o genótipo *fimA* I, produzem uma fímbria muito longa e frouxamente ligada à superfície celular (YOSHIMURA et al., 1984) devido a uma mutação em *fimB* que poderia causar essa alteração na

fímbria (NAGANO et al., 2010). Os dados indicam que a maior expressão de FimA causa o alongamento da fímbria enquanto a maior expressão de FimB as tornam mais curtas. Outros estudos devem ser realizados, visando analisar outras cepas com o genótipo *fimA* I para determinar se elas possuem uma fímbria FimA longa e frouxa e para determinar morfologicamente a fímbria Mfa 1 (YOSHIMURA et al., 2008).

É interessante notar que certas amostras de *P. gingivalis* são consideradas de maior virulência em modelos experimentais devido à sua capacidade de induzir abscessos difusos, entre elas as cepas W83 e W50, encapsuladas, afimbriadas e classificadas no genótipo *fimA* IV, enquanto a amostra 33277 que é fimbriada e não encapsulada, é capaz de induzir apenas abscessos localizados (GRENIER; MAYRAND, 1987; LAINE; VAN WINKELHOFF, 1998).

Apesar de estes dados sugerirem uma baixa relevância da expressão de fímbrias na virulência de *P. gingivalis*, muitas questões ainda devem ser respondidas para que possamos tirar conclusões definitivas. A literatura ainda não apresenta dados sobre os mecanismos e as condições ambientais que regulam a expressão de *fimA* em diferentes isolados de *P. gingivalis,* pois os estudos restringem-se a análise de baixo número de amostras de referência e a poucas condições ambientais (MASUDA et al., 2006; XIE; CAI; LAMONT, 1997). Além disso, o papel das fímbrias na colonização da cavidade oral pode ser relevante, diferindo do modelo animal onde as células bacterianas foram inoculadas diretamente no subcutâneo (GRENIER; GOULET; MAYRAND, 2001). Estas situações são particularmente diferentes do que ocorre na cavidade oral, onde a capacidade de agregar a outras bactérias no biofilme, e a fixação a superfícies do hospedeiro são pré-requisitos para a colonização. Como relatado anteriormente, as fímbrias são associadas ao desenvolvimento da periodontite induzida por *P. gingivalis* em modelos animais experimentais (JOTWANI; CUTLER, 2004;. MALEK et al., 1994; SHARMA et al., 2001).

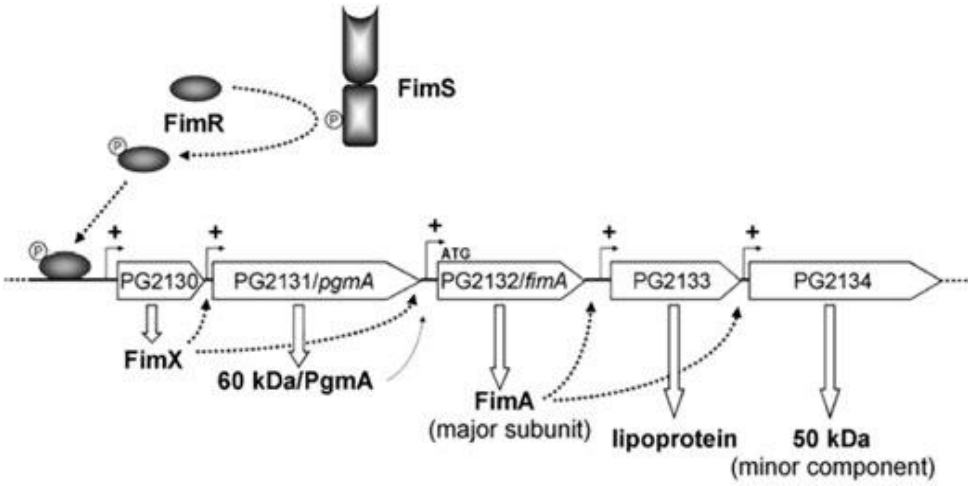
A expressão de fímbrias está associada com a formação de biofilmes por *P. gingivalis* (KUBONIWA et al., 2009). Assim, a utilização de agentes que alteram a expressão do gene *fimA*, como extrato de tabaco, induziu a aumento na formação de biofilmes por *P. gingivalis* e foi associado com expressão reduzida de cápsula (BAGAITKAR et al., 2010). Por outro lado, concentrações subinibitórias de azitromicina e temperaturas elevadas induzidas pelo processo inflamatório

resultaram em menor expressão de fímbrias em *P. gingivalis* (AMANO et al., 1994; LO BUE et al., 1997).

A biossíntese das subunidades protéicas da fímbria FimA é regulada por um sistema de dois componentes FimS–FimR (HAYASHI et al., 2000). Sistemas regulatórios de dois componentes são reconhecidos como mecanismos de transdução comuns em procariotos que levam à regulação das funções celulares em resposta às mudanças nas condições ambientais. Consistem em uma proteína histidina quinase sensora localizada na membrana citoplasmática e um regulador de resposta citoplasmático. Após a percepção do estímulo externo, que pode ser um íon, molécula, temperatura, pressão osmótica e outros, pelo domínio sensor periplasmático da histidina quinase, ocorre a indução da autofosforilação de um resíduo conservado de histidina no domínio quinase citoplasmático. O grupo fosforil é então transmitido para um resíduo aspartato conservado no domínio receptor do regulador de resposta, induzindo sua alteração conformacional. O regulador de resposta ativado funciona então como um regulador da transcrição modulando a expressão dos genes alvo (CHANG; STEWART, 1998).

FimS é uma proteína histidina quinase e FimR, o regulador de resposta. A interrupção de *fimR* ou de *fimS* causa uma deficiência na transcrição de *fimA* e assim a expressão de FimA é drasticamente reduzida em mutantes *fimR* deficientes (HAYASHI et al., 2000). O grupo da Profa. Margaret Duncan, do Forsyth Institute demonstrou que *fimR* não se liga diretamente ao promotor do operon *fimA*, mas à região promotora do primeiro gene (*pg2130*) no *cluster fimA*. O produto de *pg2130* regula por sua vez a expressão de outros genes no *cluster fimA*, incluindo o gene *fimA* (NISHIKAWA et al., 2004), como apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Cascata de regulação da expressão do gene *fimA*.



Fonte: Nishikawa et al. 2004

Como exposto anteriormente, a cepa W83 é afimbriada, diferindo da cepa 33277, fimbriada. Os genes *fimS, fimR* e o cluster *fimA* estão presentes em ambos genomas e apresentam grande homologia (dados não demonstrados).

No entanto, uma notável diferença entre essas duas cepas pode ser detectada nas sequências contendo a porção N-terminal e região promotora de *fimS*. Esta diferença poderia explicar a diferença no fenótipo entre 33277 e W83, e poderia interferir na expressão de *fimS* e consequentemente na regulação do cluster *fimA*, cuja transcrição depende da ligação a FimR fosforilada por FimS, após o recebimento do sinal pelo sensor. Curiosamente, uma sequência altamente homóloga a esta porção está presente em outra região no genoma da cepa W83 (HAYASHI et al., 2000), sugerindo que alterações na região promotora de *fimS* foram resultado da plasticidade do genoma, como a inserção de uma região por transferência horizontal. A região a montante de *fimS* (900pb) tem conteúdo G+C de 43% enquanto o genoma de *P. gingivalis* tem 48%. No entanto, é dificil dizer se somente esta região foi transferida horizontalmente, pois a %GC de *fimS* é de 41%.

Pelas evidências apresentadas sobre a variabilidade de fatores de virulência como fímbria e cápsula em *P. gingivalis*, este estudo avaliou o polimorfismo da região *fimS / fimR* e do gene *pg2130* e sua relação com a regulação de *fimA* em cepas de *P. gingivalis* caracterizadas filogeneticamente. Devido à intensa recombinação relatada para *P. gingivalis*, selecionamos para a caracterização a técnica de PFGE (OLIVE; BEAN, 1999), uma metodologia capaz de discriminar a

presença de grandes inserções ou deleções, que foi anteriormente utilizada com êxito para estudos epidemiológicos com *P. gingivalis* (ASANO et al., 2003).

Como um importante patógeno periodontal, *P. gingivalis* depende da interação com o epitélio gengival para a colonização dos sítios subgengivais e indução do processo inflamatório destrutivo dos tecidos periodontais. Embora as fímbrias sejam consideradas a principal estrutura de superfície bacteriana para esta interação, estudos relataram que cepas não fimbriadas apresentam virulência aumentada em modelos animais. Assim, a fim de contribuir para o conhecimento sobre a expressão de fímbrias em *P. gingivalis*, testamos a hipótese de que o polimorfismo de *fimS* poderia resultar em expressão diferencial de fímbrias em *P. gingivalis*, e que essas diferenças estariam associadas com certas linhagens. Além disso, o efeito da interação com células epiteliais e outras alterações ambientais sobre a transcrição de *fimA*, *fimS* e *fimR*, foram avaliados em cepas clínicas de *P. gingivalis*.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral: contribuir para o conhecimento sobre a expressão de fímbrias em *P. gingivalis.*

Objetivos específicos:

Avaliar cepas clínicas de *P. gingivalis* caracterizados quanto a produção de cápsula, genótipo *fimA* e perfil de macrorestrição, quanto a:

- polimorfismo da região promotora de *fimSR* e do gene *pg2130*.
- transcrição relativa de *fimA, fimS* e *fimR* em culturas *in vitro* e após a interação com células epiteliais.
- eficiência de adesão a células epiteliais gengivais.
- expressão das fímbrias, determinada por Western-Blot utilizando anticorpos policlonais contra FimA e por microscopia eletrônica de transmissão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas Bacterianas e condições de cultura

Foram analisadas as cepa de *P. gingivalis* de referência ATCC 33277 (*fimA* I, fimbriada e não encapsulada) e W83 (*fimA* IV, afimbriada e encapsulada) e 21 cepas provenientes do Japão, Suécia e Brasil (APÊNDICE A), cujo genótipo *fimA* foi determinado em estudo prévio realizado em nosso laboratório (Umeda et al., 2006). As amostras foram caracterizadas quanto à relação filogenética por tipagem por sequenciamento multi lócus (MLST), também em estudo prévio realizado neste laboratório (Dissertação de Mestrado de Talyta D'Epiro, 2011). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos n. 846/2008 e pelo Comitê de ética em pesquisa com animais n. 016/2010 do Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

Todas as cepas foram mantidas em caldo BHI contendo 20% de glicerol em freezer a -80 ^{o}C. As amostras foram cultivadas em placas de ágar sangue suplementado com hemina (0,5 mg/ml) e menadione (1 mg/ml) (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) sob atmosfera de anaerobiose (85% N_2, 5% CO_2 e 10% H_2) obtida em câmara de anaerobiose (Plas Labs, Lansing, MI, EUA) durante 10 a 15 dias. Para obter culturas de *P. gingivalis* em fase exponencial de crescimento, as amostras foram cultivadas em caldo Triptone soja suplementado com hemina (0,5 mg/ml) e menadione (1mg/ml) (TSBHK) até atingir a DO_{660nm} ~ 0,5.

3.2 Detecção de fímbria e cápsula por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após a obtenção das culturas, estas foram levadas ao setor de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, onde foi realizado o preparo do material e exame microscópico sob a supervisão do pesquisador Jonas José Kisielius.

3.2.1 Detecção de fímbria

Amostras bacterianas foram cultivadas em meio sólido TSBHK por 72 h em câmara de anaerobiose. Grades de cobre revestidas por carbono foram tratadas com solução de Alcian Blue a 2 % por 10 min, para melhorar a adesão das células

bacterianas. Uma colônia de cada amostra da bactéria foi coletada e ressuspensa em 10 µl de PBS. A grade foi colocada sobre a gota da suspensão bacteriana em PBS e mantida por 10 min, para permitir a adesão das células.

Após a adesão, as grades foram coradas por 10 min e lavadas em água destilada para remoção do excesso de corante. Para a visualização das fímbrias foram testados dois tipos de coloração, utilizando o Molibidato de amônio (1%) como descrito por Nishikawa and Duncan, 2010 e o Fosfotungstato de potássio a 2%, como descrito por LoBue et al., 1997.

As células bacterianas foram visualizadas em Microscópio eletrônico de Transmissão modelo Jen1011 (JEOL, Tokyo, Japão).

3.2.2 Detecção de cápsula

Para a visualização da cápsula, foi realizada a visualização de cortes ultrafinos, como descrito por Davey and Duncan, 2006. Suspensões de células bacterianas, cultivadas em TSBHK até atingirem a fase exponencial, foram centrifugadas e o precipitado foi lavado 3 vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,3. O material foi fixado em glutaraldeído a 2,5%, seguindo-se fixação secundária com tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) durante 1 h, à temperatura ambiente, e então corado com solução de vermelho de Rutênio a 0,2%. Após lavagem com tampão cacodilato, foi feita a desidratação pela passagem em concentrações seriadas de etanol de 50 a 90% e inclusão em resina LR White (London Resin Company, Berkshire, Inglaterra).

Os blocos de resina foram cortados em ultramicrótomo com auxílio de faca de diamante (Diatome, Biel, Suiça) resultando em cortes com ~ 100 nm de espessura.

As células bacterianas foram visualizadas em Microscópio eletrônico de Transmissão modelo Jen1011.

3.3 Detecção de cápsula por microscopia óptica

Culturas de *P. gingivalis* em fase exponencial de crescimento foram coradas negativamente pelo método de Hiss, como descrito por Doetsh, 1981. As células foram misturadas a 5 µl de soro equídeo em uma lâmina e o esfregaço foi coberto

com álcool metílico para fixação. Após secagem, foi adicionada solução de violeta genciana (0,75%), seguindo-se lavagem com solução de sulfato de cobre.

A presença da cápsula foi evidenciada em microscópio óptico, pela observação de halos brancos ao redor da célula bacteriana.

3.4 Tipagem usando Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

3.4.1 Preparação do plug

As amostras foram cultivadas em meio sólido, como descrito na seção 3.1. As colônias foram transferidas para tubos e as células lavadas por duas vezes com tampão Tris EDTA (10 mM Tris HCl e 1 mM EDTA, pH 8,0). A suspensão bacteriana foi ajustada a DO_{400nm} ~ 3 e alíquotas de cada suspensão bacteriana foram adicionadas ao mesmo volume de solução de lise e incubadas a 37 °C por 10 min. Após a incubação, os tubos foram misturados gentilmente e acrescidos de agarose para PFGE Seakem Gold Agarose (Lonza, Rockland, ME, EUA) na concentração 1,2%, aquecida a 56 °C. A mistura foi imediatamente dispensada nos moldes dos poços. Após a solidificação, os *plugs* foram adicionados em tubos contendo 3 ml de tampão de lise celular (50 mM EDTA, pH 8,1% sarcosina, proteinase K 20 mg/ml) seguindo-se incubação a 55 °C por 16 h com leve e constante agitação em banho-maria. Os *plugs* foram lavados por 4 vezes com 15 ml de tampão Tris EDTA a 50 °C por 15 min, com constante e vigorosa agitação. O tampão foi removido e os *plugs* foram estocados em tampão Tris EDTA a 4 °C até a digestão.

3.4.2 Digestão dos plugs e Corrida eletroforética

Para a digestão do DNA cromossômico de *P. gingivalis* nos *plugs* de agarose foi utilizada a enzima de restrição *Not1* (ASANO et al., 2003). Os *plugs* foram adicionados a tubos de centrífuga acrescidos de 2U da enzima, seguindo-se incubação a 37 °C por 24 h. Após a digestão, os *plugs* foram inseridos em poços de gel de agarose a 1 % em Tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X (Tris base a 0,9 M, ácido bórico a 0,9 M e EDTA a 0,02 M, pH 8,0). Peso molecular Lambda Ladder PFGE marker (New England, Biolabs, Ipswich, MA, EUA) foi inserido no primeiro e no último poço. A corrida eletroforética foi realizada em aparelho para PFGE CHEF-

DR III System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) utilizando como tampão de corrida TBE 0,5X. O gel de agarose foi corado em solução de brometo de etídeo e fotografado sob luz ultravioleta.

3.4.3 Interpretação dos resultados obtidos por PFGE

A similaridade das amostras, obtida através do perfil das bandas geradas PFGE, foi calculada através do coeficiente de Dice utilizando o programa Bionumerics (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Bélgica). O mesmo programa foi utilizado para construir um dendrograma baseado na análise de clusters, através do método de UPGMA.

3.5 Análise do polimorfismo das regiões *fimSR* e de *pg 2130*

Para análise do polimorfismo da região *fimSR* e de *pg2130*, foram obtidos fragmentos amplificados a partir do DNA de cada uma das amostras de *P. gingivalis* analisadas. A região promotora de *fimS*, bem como uma região de 2.092 pb de *fimSR* e o gene *pg2130* foram avaliados através da análise das sequências. O gene *fimR* foi detectado por PCR e usado como controle das reações, uma vez que este gene está presente em todas as amostras.

3.5.1 Condições gerais

O DNA genômico de *P. gingivalis* foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi armazenado em freezer –20 ^{o}C até o momento do uso. A concentração e pureza do DNA foram determinadas através da medida de absorbância em espectrofotômetro (ND-1000, Nanodrop, Wilmington, DE, EUA) a 260 nm / 280 nm.

Os iniciadores utilizados foram sintetizados pela empresa Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Para a reação de amplificação foi utilizada Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Em todas as reações foi utilizado cerca de 100 ng de DNA genômico, 0,5 µl de solução estoque contendo 10 mM de cada dNTP (Invitrogen), 25 pM de cada iniciador, 2,5 µL de

tampão 10x PCR e 2,5 U de Platinum Taq DNA polimerase, em um total de reação de 25 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Byosistems, São Paulo, Brasil). Controles negativos e positivos foram incluídos em cada lote de amostras analisadas. O controle negativo foi constituído da mistura padrão de PCR sem adição de DNA molde. Nos controles positivos foram utilizados DNA das amostras W83 e/ou 33277.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE - Tris acetato 40 mM, pH 8,5; 2 mM EDTA) e corados com brometo de etídio. Foram utilizados como marcadores de Peso Molecular 1 kb DNA ladder ou 100 bp DNA ladder (Invitrogen), de acordo com o tamanho do amplicom esperado. Os fragmentos específicos foram visualizados e documentados sob luz ultravioleta em transiluminador (Pharmacia Biotech, São Francisco, CA, EUA).

Quando indicado no texto, os amplicons foram submetidos a sequenciamento. Os amplicons foram purificados do gel utilizando o kit QIAquick gel extraction (Qiagen, Valência, CA, EUA) seguindo instruções do fabricante e mantidos a -20 ºC até o momento do processamento na reação de sequenciamento.

Os sequenciamentos foram realizados no serviço de sequenciamento do Instituto de Química (IQ - USP, São Paulo, Brasil) ou no Centro de Estudos do Genoma Humano, utilizando um ou ambos iniciadores anteriormente utilizados em cada reação de PCR. As sequências gênicas foram analisadas usando o software BioEdit e alinhadas utilizando o software SeqMan, ambos da DNAStar (Madison, WI, EUA).

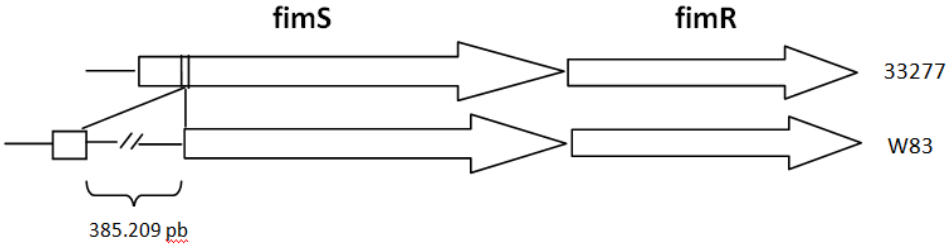
3.5.2 Detecção de fimR

O gene *fimR* foi amplificado usando os iniciadores descritos por Hayashi et al., 2000 (fimR-5: ATG ATT AGT ATC GTA CTC GTG GAT e fimR-3: TTA GTG GAT TGG CAA TAG), resultando em um produto de 573 pb. As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 30 s e um ciclo de extensão final a 72 °C por 7 min.

3.5.3 Análise do polimorfismo da região promotora de fimS

Devido a diferenças nas sequências da provável região promotora do gene *fimS* entre as cepas 33277 e W83, como apresentado na Figura 2, dois pares de iniciadores, cada par específico para 33277 ou W83, foram desenhados utilizando o programa Primer Select, DNAstar. As amplificações foram realizadas com um dos pares de iniciadores fimS 33277 [(5'CTT TCG ACC ATT ACA GGA G3' e 5'CAC GGC AGA ACT TGA TGG3') e fimS W83 (5'GAT CTG CTT CAA GTC GGC TAC TG3' e 5'CAC GGC AGA ACT TGA TGG3')].

Figura 2 - Esquema mostrando que a região a montante do gene *fimS* difere entre as cepas 33277 e W83, pela possível inserção de um fragmento de 385.209pb no cromossomo de W83.



Fonte: Adaptado de Nishikawa et al. (2010)

As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 30 s e um ciclo de extensão final a 72 °C por 7 min. Os amplicons foram sequenciados utilizando um dos iniciadores em cada reação e o kit de sequenciamento Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi realizada em termociclador (MJ Research, Walthan, MA, EUA) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 96 ºC por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96 ºC por 45 s, anelamento a 58 ºC por 30 s e extensão a 60 ºC por 4 min. Os produtos foram precipitados com etanol 100%, 1,15 µl de 3 M NaOAc (pH 5.2) e 1,15 µl de glicogênio (1 mg/ml), lavados com etanol 70% e enviados para o serviço de sequenciamento do Instituto de Química (IQ - USP, São Paulo, Brasil).

3.5.4 Análise da sequência da região fimS/fimR

Como a maioria das amostras apresentou a região promotora de *fimS* similar a W83, decidimos analisar a região entre os genes *fimS-fimR*. Uma região de 2.092 pb, compreendendo *fimS*, a região intergênica, *fimR*, e 600 pb a jusante de *fimR* foi amplificada e analisada (Figura 3), com base na sequência da cepa 33277 (número de acesso AP009380.1).

Devido ao tamanho da região a ser analisada, foram realizadas 3 amplificações, como apresentado na figura 3, os fragmentos foram sequenciados, e as sequências alinhadas. Para a amplificação foram utilizados os pares de iniciadores apresentados na Tabela 1. As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 54 °C por 30 s, 72 °C por 90 s e um ciclo de extensão final a 72 °C por 7 min.

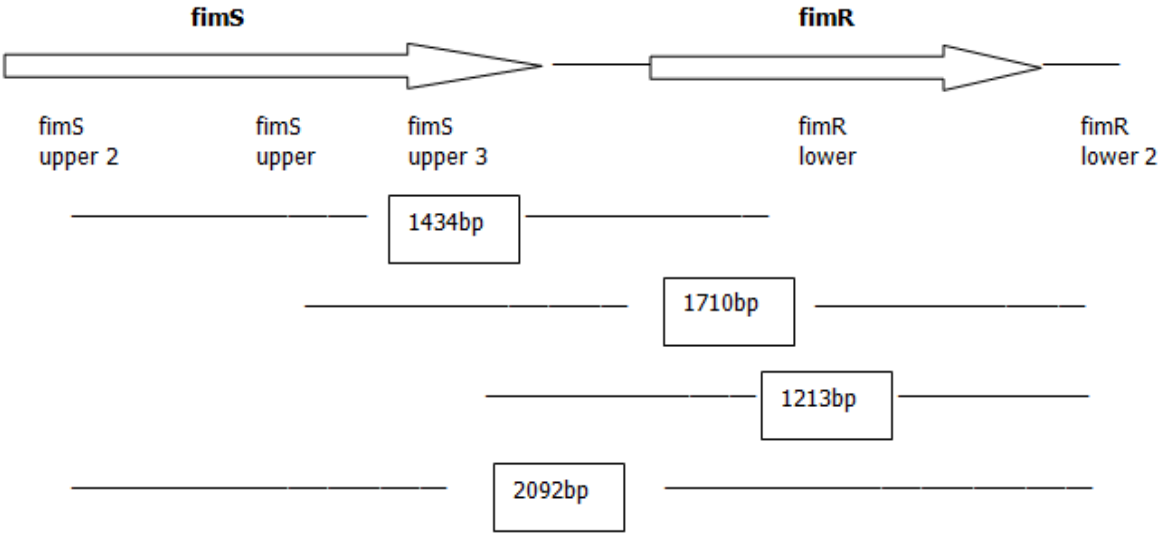
Os sequenciamentos foram realizados no serviço de sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano, onde foi realizado o sequenciamento utilizando ambos iniciadores que foram utilizados em cada reação de PCR, em um total de 6 sequenciamentos por amostra.

As sequências de 2.092 pb de 6 cepas de *P. gingivalis* foram então alinhadas, e analisadas utilizando o programa MegAlign, do pacote DNAstar.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação da região *fimSR*

iniciadores	**Sequência nucleotídica (5' – 3')**
fimS upper	GAC TGC GAG AAA TGA ATG ACA CCA
fimR lower	ATC ATT GAT CTG AGC TGT TTT GCA
fimS upper 2	GAA TAC GGC AAA GCA AAT GAA GTG
fimS upper 3	AGT GTC TGT ATC AGA CAA AGG T
fimR lower 2	ACA ATG ATA AAA ACG CCC AG

Figura 3 - Esquema representando a localização dos iniciadores utilizados para amplificação da região *fimSR* de *P. gingivalis* e o tamanho dos amplicons esperados utilizando como molde DNA da cepa 33277. As sequências dos iniciadores utilizados estão apresentadas na Tabela 1.



3.5.5 Análise da sequência da região promotora do gene pg2130

Pela cascata de regulação da expressão do gene *fimA* (Figura 1), o produto do gene *fimR* se liga à região promotora do gene *pg2130*. Para análise da região de ligação de FimR e região promotora de *pg2130*, foi desenhado o par de iniciadores (2130R 5' CGT CGT ACC CCA ATA AAG CA3' e 2130F 5'TCT CGA ACC GGA ACC ATC TC3') utilizando o programa Primer Select, do pacote DNAStar.

As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 54 °C por 30 s, 72 °C por 30 s e um ciclo de extensão final a 72 °C por 7 min, resultado em um produto de 400 pb

Os amplicons foram enviados ao Centro de Estudos do Genoma Humano onde foi realizado o sequenciamento utilizando ambos iniciadores que foram utilizados em cada reação de PCR.

Foram analisadas as mesmas 6 amostras analisadas na seção 3.5.4.

3.6 Interação de cepas de *P. gingivalis* a células epiteliais gengivais

Foi utilizada a linhagem epitelial gengival OBA-9. Para este estudo foi inicialmente determinada a MOI a ser utilizada para análise da eficiência de adesão

que possibilitaria também a análise da transcrição de genes das células bacterianas aderidas a células epiteliais. A maioria dos estudos de interação realizados com *P. gingivalis* utiliza uma MOI de 1:100 (BOISVERT; DUNCAN 2008; YUAN et al., 2008). No entanto, estudos anteriores neste laboratório, além de outros descritos na literatura (HANDFIELD et al., 2005; RICHARDSON et al., 2005) mostraram que para análise da expressão das bactérias aderidas há a necessidade de uso de maior concentração de células bacterianas, propiciando a obtenção de maior concentração de RNA bacteriano, visto que na baixa MOI, a maior parte do RNA é originada na célula eucarionte.

Foi realizado ensaio com *P. gingivalis* nas condições controle e após a adesão, nas MOI: 1:300 e 1:3.000, para as amostras 279C1 e 6/26, escolhidas ao acaso, como será descrito na seção 3.6.1. Após a interação célula epitelial-bactéria, foi determinado o número de UFC de *P. gingivalis* aderidas por poço (eficiência de adesão), como descrito na seção 3.6.3. A transcrição gênica das amostras de *P. gingivalis,* após adesão e controle, foi analisada por reação de transcriptase reversa seguindo-se PCR quantitativo, como descrito na seção 3.6.7.

Após análise destes resultados, optamos por realizar a análise nas demais amostras utilizando a MOI 1:3.000. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três reações independentes, para determinar a sua reprodutibilidade.

3.6.1 Células epiteliais e condições de cultivo

Células de linhagem epitelial gengival, denominadas células OBA-9, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Shinya Murakami da Universidade de Osaka, Japão.

As células OBA-9 foram cultivadas em frascos de cultura de células de 75 cm^2 recobertos com colágeno tipo I contendo 20 ml de meio queratinócito suplementado livre de soro – KSFM (Invitrogen) e 200 µg/ml de penicilina / estreptomicina (Invitrogen), como descrito por (COSTEA et al., 2005) a 37 ^oC em 5% CO_2 (TC 2123; Shell Lab, Cornelius, OR, EUA). Quando alcançaram a semi confluência, as células OBA-9 foram lavadas 2 vezes com 10 ml de PBS (0,1M; pH 7,4) e suspensas por adição de 2 ml de tripsina e incubação por 5 min em estufa de CO_2. Posteriormente à incubação, foi adicionado 2 ml de solução de inibidor de tripsina (10 mg/ml) e as suspensões celulares foram transferidas para um tubo de

centrífuga estéril e submetidas à centrifugação a 237 xg a 15 ºC durante 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em meio queratinócito livre de soro. Alíquotas de células viáveis foram distribuídas em placas de 24 poços recobertas por colágeno tipo I correspondendo a $2x10^5$ céls/poço (determinadas pela contagem após coloração com azul de tripan em câmara de Newbauer) e incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2. Após a formação da monocamada, correspondendo a ~ $3x10^5$ céls./poço, cada poço foi lavado com PBS para a remoção dos antibióticos.

3.6.2 Ensaio de adesão

Amostras de *P. gingivalis* em fase exponencial de crescimento em meio TSBHK foram centrifugadas, e as células ressuspensas em meio KSFM sem antibiótico. Alíquotas de 50 µl das suspensões bacterianas correspondendo a $9X10^8$ UFC/poço foram adicionadas à monocamada de células OBA-9, correspondendo a ~ $3X10^5$ céls/poço, perfazendo uma MOI de 1:3.000 [e 1:300 no ensaio de padronização da MOI] (HANDFIELD et al., 2005; RICHARDSON et al., 2005). Em seguida foram acrescidos a cada poço 950 µl de meio queratinócito suplementado sem antibióticos. As placas foram, então, submetidas à centrifugação 593 xg, 2 min, para favorecer a interação bactéria-célula epitelial (INABA; NAKANO; KATO, 2008). As placas foram incubadas em estufa de CO_2 por um período de 2 h a 37 ºC, para que ocorresse a interação da bactéria com as células epiteliais, as bactérias não aderidas foram removidas com PBS. Poços sem a adição de células foram usados como controle.

3.6.3 Eficiência de adesão de P. gingivalis à célula epitelial

Para a determinação do número de UFC de *P. gingivalis* aderidas por poço, as células epiteliais foram descoladas pela adição de 1 ml de solução de tripsina (Tryple Express, Invitrogen), seguindo-se incubação por 4 min em estufa. As suspensões celulares foram homogeneizadas com pipeta e diluídas em PBS. Alíquotas de 100 µl de diluições seriadas em PBS das suspensões de células foram semeadas em triplicata em placas de ágar sangue com hemina e menadione e incubadas durante 5 dias em câmara de anaerobiose para posterior contagem de

viáveis (UFC) e cálculo do número de UFC de bactérias aderidas/poço. A eficiência de adesão foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Eficiência de adesão (\%)} = \frac{\text{UFC de } \textit{P. gingivalis} \text{ aderidas às células epiteliais} \times 100}{\text{UFC de } \textit{P. gingivalis} \text{ nos poços controle}}$$

3.6.4 Transcrição de fimA, fimS e fimR

A transcrição realtiva de *fimA, fimS* e *fimR* foi determinada através de reação de transcriptase reversa, seguindo-se PCR em tempo real.

Foram analisadas as amostras de referência W83 e 33277, após desenvolvimento de culturas *in vitro* (3.6.1). Foram também analisadas as amostras de referência W83 e 33277 submetidas a diferentes condições de temperatura, pH e osmolaridade, e estas comparadas a condição controle, em meio de cultura (TSBHK) mantido a 37 ºC (seção 3.6.2). Além disso, todas as cepas de referência e clínicas foram analisadas quanto à transcrição relativa dos genes *fimA, fimS* e *fimR* em ensaio após interação com células epiteliais após 2 horas, e estas comparadas à condição controle, sem interação com células epiteliais, mantidas em meio para cultura de células KSFM, considerada a condição controle (seção 3.6.4).

Após extração do RNA, este foi utilizado para síntese de cDNA (seção 3.6.6) e determinação da transcrição como descrito na seção 3.6.7.

3.6.5 Transcrição relativa de fimA, fimS e fimR após interação com a célula epitelial

Foram utilizadas células bacterianas após adesão a células epiteliais obtidas como descrito naseção 3.6 e como controle as suspensões bacterianas submetidas às mesmas condições, porém, sem a presença das células epiteliais gengivais OBA-9.

Após lavagem com PBS para remoção das células bacterianas não aderidas, foi adicionado 250 µl de Trizol (Invitrogen) em cada um dos 4 poços para cada amostra bacteriana em placa de 24 poços. As suspensões de células foram homogeneizadas e transferidas para um tubo de centrífuga estéril, agitadas em

vortex e incubadas por 5 min a 25 ºC para permitir a completa dissociação do complexo nucleoproteico.

Para os controles sem a presença da célula epitelial, as suspensões bacterianas foram coletadas após incubação por 2 h nas mesmas condições e centrifugadas 5.200 xg durante 4 min a 4 ºC. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 ml de Trizol, e as suspensões agitadas em Vortex e incubadas por 5 min a 25 ºC.

Seguiu-se extração de RNA e análise da transcrição como descrito na seção 3.7.4.

3.6.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído usando Trizol (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Após a extração com clorofórmio, o RNA foi precipitado com isopropanol e lavado com etanol 70%. Após a extração foi realizada uma reação de PCR com iniciadores para a região *16SrRNA* de *P. gingivalis* (16S F – 5´ GTCAATGGGCGAGAGCCTGAA 3´ / 16S R- 5´ AGTGTCAGTCGCAGTATGGCAA 3´) (NISHIKAWA et al., 2010) para detectar a presença de possíveis vestígios de DNA contaminante. Na presença de DNA, foi realizado o tratamento do RNA com DNase (DNase I, Invitrogen) e uma nova reação de PCR. A quantidade e integridade do RNA foram determinadas através de espectofotômetro (Nanodrop). Para a transcrição reversa do RNA purificado, uma mistura de 10 µl contendo 1 µg de RNA, 1 µl de hexâmeros randômicos e 1 µl de dNTPs (2,5 mM cada) foi desnaturada a 65 °C por 5 min e então colocada em gelo. A essa mistura foi adicionado 2 µl de tampão first-strand, 2 µl de 0.1 M dithiothreitol (DTT), 1 µl de RNase OUT e 1 µl de Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) em um total de 20 µl e incubado para anelamento à temperatura ambiente por 10 min, seguido de incubação para síntese de cDNA a 50 °C por 50 min e 85 °C por 5 min.

3.6.7 Análise da transcrição relativa

PCR em tempo real foi realizado utilizando o termociclador Step One plus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações contendo 100 ng de cDNA e 200 mM de cada iniciador gene específico foram preparadas com

10 µl SYBR green real-time PCR Master Mix (Biotools, Madrid, Espanha) para uma reação de 20 µl.

Iniciadores específicos para *fimS* e *fimR* foram utilizados como descrito por Nishikawa et al., 2010 (fimS F- 5´GACTGCGAGAAATGAATGACACCA 3´/ fimS R 5´ACCTTTGTCTGATACAGACACTTT3´). O par de iniciadores para *fimA* (FimA f - TGT TGG GAC TTG CTG CTC TTG CTA; FimA r - TAA CGG GTT CTG CCT CGT TGT CTT) foi desenhado baseado na região conservada dos diferentes *fimA* utilizando o programa Primer Select (DNAstar). A expressão dos genes foi normalizada ao gene endógeno *16SrRNA* (16S F- 5' GTCAATGGGCGAGAGCCTGAA3´; 16S R – 5´AGTGTCAGTCGCAGTATGGCAA 3´) (Nishikawa et al. 2010). As reações foram realizadas com pré-incubação 95 ^{o}C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 95 ^{o}C por 10 s e 60 ^{o}C por 5 s. Após a reação foi realizada a curva de dissociação para verificar a especificidade dos amplicons. A cepa 33277 foi escolhida como calibradora. Os níveis de expressão foram calculados de acordo com o método utilizado por Pfaffl, 2001 para quantificação relativa.

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão de reações de triplicatas com em três ensaios distintos.

3.7 Análise da transcrição de *fimA, fimS e fimR* após desenvolvimento em meio líquido

Para determinar diferenças na transcrição gênica entre as amostras W83 e 33277, e padronizar as reações, foi realizado ensaio após desenvolvimento de culturas *in vitro* em caldo TSBHK em fase exponencial de crescimento. Após centrifugação da cultura a 7.000 Xg, por 10 min, as células no precipitado foram submetidas a extração do RNA.

3.7.1 Análise da Transcrição relativa de *fimA, fimS e fimR* em diferentes condições ambientais

Transcrições relativas de *fimA, fimS* e *fimR* das cepas 33277 e W83 foram determinadas para culturas submetidas a diferentes condições ambientais. Culturas em fase exponencial em caldo TSBHK foram aliquotadas em volumes de 10 ml em

seis tubos e submetidas a centrifugação a 3000 xg por 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em TSBHK (pH 7,0; controle), TSBHK (pH 7,0) diluído 1:10 em água, TSBHK pH 5 e PBS (pH 7,0). As suspensões foram incubadas por 30 min a 37 ^{o}C. Células suspensas em TSBHK (pH 7,0) foram também incubadas a 33 ^{o}C e 42 ^{o}C, por 30 min. Após a incubação, as suspensões bacterianas foram submetidas a nova centrifugação, o precipitado foi armazenado em RNALater até o momento de extração de RNA (seção 3.6.6), e realizada a análise de transcrição como descrito na seção 3.6.7.

3.8 Detecção da proteína da fímbria

3.8.1 Desenvolvimento de anticorpos policlonais contra peptideos sintéticos FimA

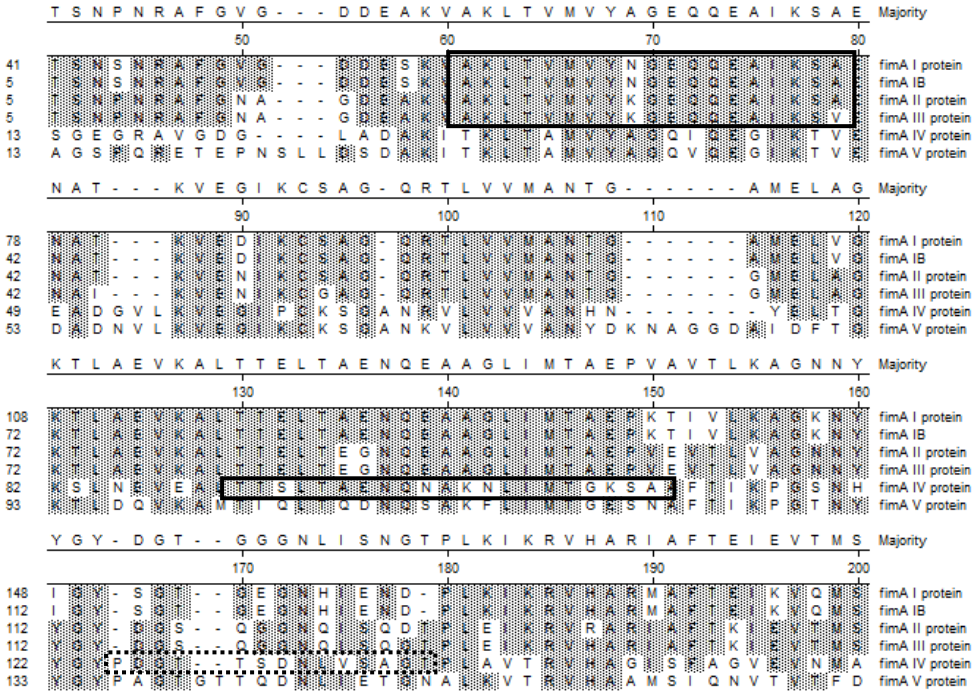
As sequências de proteínas dos diferentes tipos FimA foram obtidas no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein [FimA I (YP_001928296), FimA II (Q51825), FimA III (Q51826.1), FimA IV (Q51827), FimA V (Q9S0W8.1) e FimA Ib (Q93R80.1)] e alinhadas utilizando o software MegAlign (DNAstar) (Figura 4). Três peptídeos, um conservado entre os genótipos *fimA* I e Ib (KVAKLTVMVYNGEQQEAIKS), o segundo entre os genótipos *fimA* II e III (KVAKLTVMVYKGEQQEAIKS) e o terceiro (ALTTSLTAENQNAKNLIMTGKS) em *fimA* IV foram desenhados baseados nas regiões conservadas (Figura 4). Nenhum peptídeo para o tipo V foi desenhado, devido à prevalência muito baixa deste tipo em amostras clínicas (MISSAILIDIS et al., 2004), mas os peptídeos P1 e P2 apresentavam 11 aminoácidos conservados com este tipo *fimA*.

Os peptídeos foram sintetizados comercialmente pela empresa GenScript (Piscataway, NJ, EUA) com pureza >85% determinada por HPLC e espectrometria de massa. Para aumentar a resposta imune, os peptídeos foram conjugados a um carreador mcKLH, utilizando o kit Imject EDC Carrier Protein (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), seguindo instruções do fabricante. Após a conjugação, os peptídeos foram usados como antígenos para gerar anticorpos. Camundongos BALB/C (5-6 semanas de idade) foram inoculados intraperitonealmente com 50 µg de cada peptídeo, separadamente, com adição de alúmen como adjuvante no dia 0, potenciado com a mesma dose no dia 7. Amostras de soro foram obtidas antes

da primeira inoculação (como controle) e no 14º dia e os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA. Quando títulos séricos elevados de anticorpos foram atingidos, os animais foram sacrificados e os soros obtidos por punção retrorbital.

Além disso, outro peptídeo anti-fimA IV foi gentilmente cedido pelo Dr. Kyioshi Nishikawa.

Figura 4 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de FimA de diferentes genótipos *fimA*.



Peptídeos sintetizados para esse estudo estão em linha contínua e a sequência utilizada por Nishikawa et al 2010 está em linha tracejada.

3.8.2 Western-blot

Foram utilizadas culturas de *P. gingivalis* em meio sólido com 3 dias de crescimento, nas mesmas condições utilizadas para visualização das fímbrias por MET (seção 3.2).

Colônias foram ressuspensas em PBS e foi ajustada a DO_{600nm} ~ 1. As suspensões foram então centrifugadas a 1.000Xg por 2 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as células foi ressuspenso em tampão de lise

(50 mM Tris–HCl, 1% Triton, 0,5 mg/ml PMSF, 10mg/ml lisozima), seguindo-se incubação por 10 min em temperatura ambiente. A lise foi finalizada com uso de sonicador (10 W) por 3 pulsos de 10 s cada, em banho de gelo.

Os extratos protéicos foram aquecidos a 100 °C por 10 min em tampão de corrida (4% SDS, 10% b-mercaptoetanol, 20% glycerol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125 M Tris HCl) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, utilizando como marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad) em tampão de corrida (Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%).

Imediatamente após a corrida, as proteínas separadas em gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em câmara de Western Blot contendo Tampão de Transferência (Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%) em corrente 100 V por 60 min. As membranas foram incubadas com tampão TBST (20 mM Tris–HCl, 0,5 M NaCl, 0,1% Tween) contendo 3% BSA (albumina de soro bovino) por 60 min para bloqueio de sítios não específicos, e então incubadas com os anticorpos policlonais específicos para os peptídeos sintéticos das fímbrias (obtidos como descrito na seção 3.8.1) diluído 1:500 em TBST + 3% BSA por 90 min, em temperatura ambiente, sob leve e constante agitação. Seguiu-se 4 lavagens por 10 min com TBST e incubação por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (para o anticorpo anti FimA I) ou coelho (para o anticorpo anti FimA IV), conjugados à peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, EUA), diluídos 1:1.000 em TBST + 3% BSA. Para a detecção do sinal foi utilizando o reagente ECL Plus (Amershan, Piscataway, NJ, EUA), conforme instruções do fabricante. A membrana foi então exposta ao filme radiográfico IBF-Medix (IBF, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em câmara escura, seguindo-se revelação e fixação. As bandas de proteínas foram visualizadas no filme radiográfico.

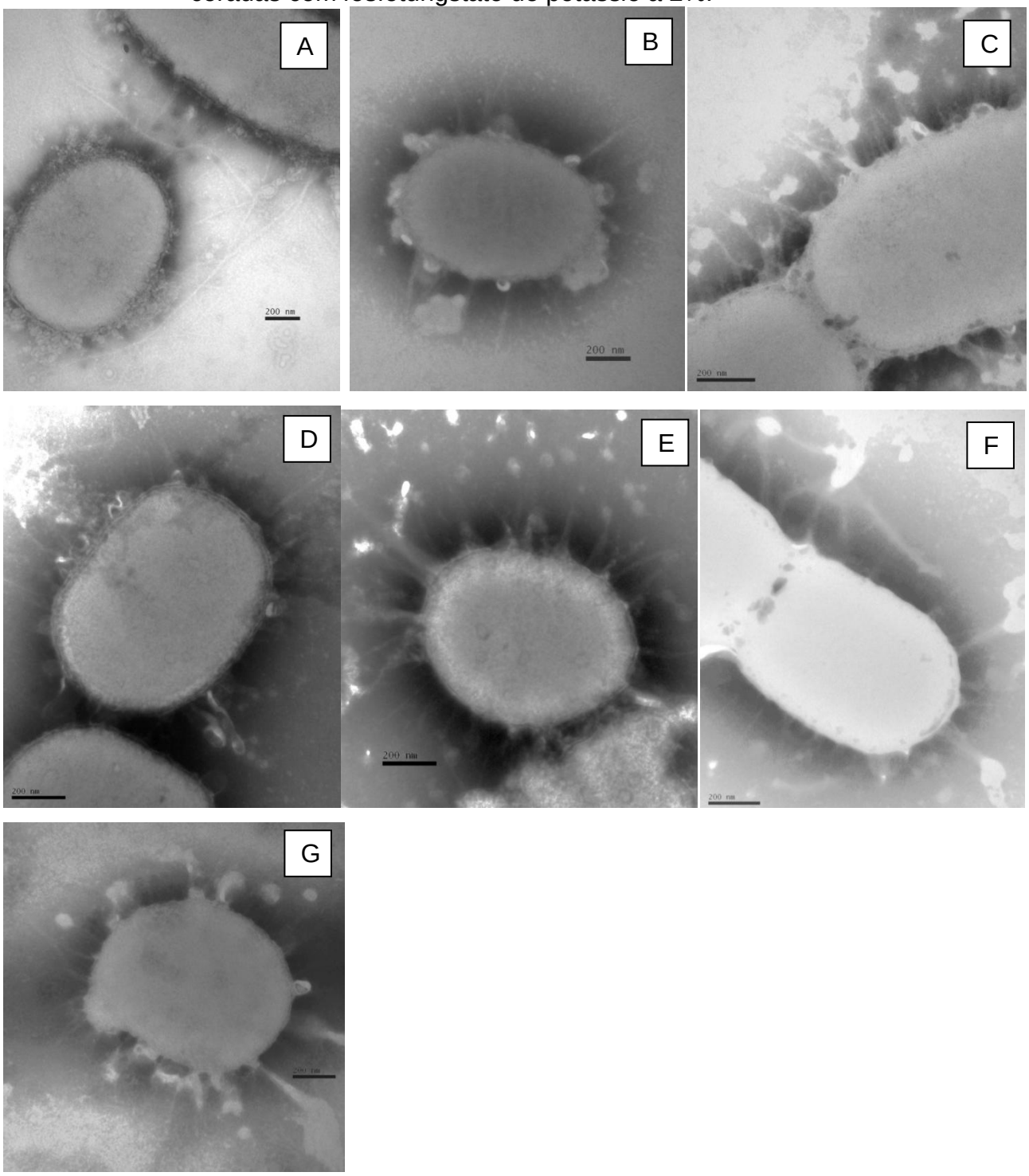
4 RESULTADOS

4.1 Detecção de fímbria e cápsula através Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para padronização do ensaio, foi utilizada suspensão de bactérias cultivadas em meio líquido na fase exponencial de crescimento (obtida conforme seção 3.3). No entanto, nesta condição não foram visualizadas fímbrias, nem mesmo na amostra de referência 33277. Esta observação não significa que esta cepa não expresse a fímbria sob esta condição de cultivo, mas sendo a fímbria longa muito frágil, esta provavelmente pode ter sido danificada, particularmente devido ao transporte em meio líquido. A análise foi então realizada nas células bacterianas desenvolvidas por três dias em meio sólido (placa de ágar sangue), como recomendado por Nishikawa et al, 2010.

A coloração com fosfotungstato de potássio a 2% possibilitou a visualização das fímbrias em toda a superfície bacteriana. Todos os genótipos *fimA* apresentavam cepas fimbriadas, como demonstrado na figura 5 (A-G). No total foram detectadas 15 amostras fimbriadas entre as 23 analisadas. As fotomicrografias de todas as amostras analisadas estão apresentadas no anexo 2.

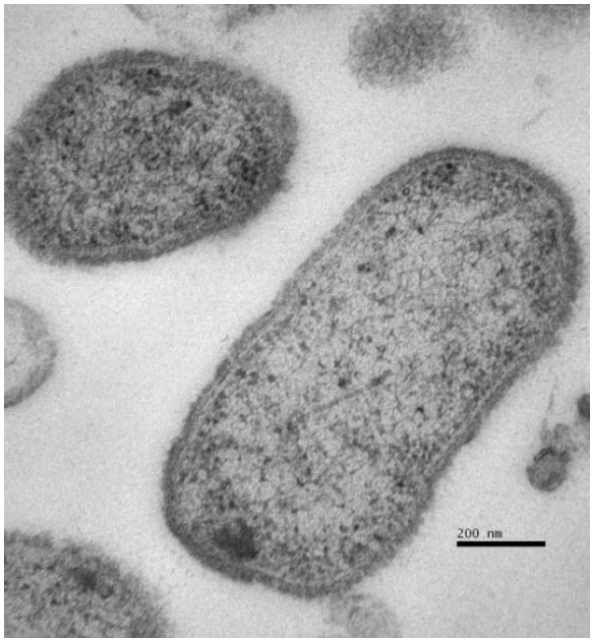
Figura 5 - Fotomicrografias eletrônicas de células de *P. gingivalis* fimbriadas, coradas com fosfotungstato de potássio a 2%.



Em A: 33277 (*fimA* I) , B: 261A1(*fimA* Ib), C: 1381A (*fimA* II), D: 6/26 (*fimA* III), E: 251C2 (*fimA* IV), F: 279C1 (*fimA* V) e G: Kd865 (NT). (NT- não tipável).

Para a visualização da cápsula por MET, utilizamos as células desenvolvidas em cultura em meio líquido na fase exponencial de crescimento. A figura 6 apresenta a micrografia eletrônica de células da cepa W83, que é capsulada e não fimbriada, corada com vermelho de Rutênio, como descrito por Davey and Duncan 2006. No entanto, a cápsula visualizada apresentou-se muito delgada e de difícil diferenciação da membrana externa quando comparada ao observado em cepas não capsuladas. Essa observação pode representar um resultado falso negativo, e outras técnicas de coloração para visualização de cápsula de *P. gingivalis* por MET deveriam ser testadas. Assim, optamos por considerar os resultados da visualização por coloração negativa em microscopia óptica para presença de cápsula.

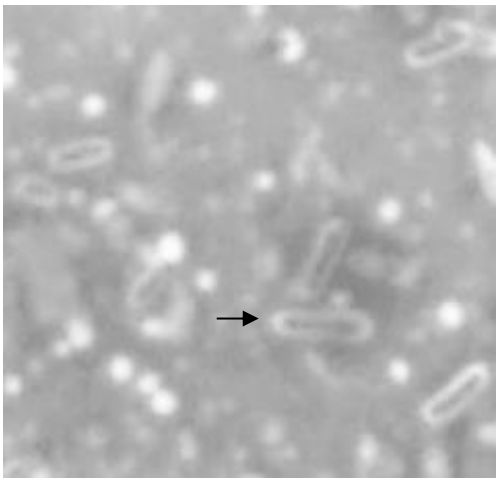
Figura 6 - Fotomicrografia eletrônica de células da cepa *P. gingivalis* W83, não fimbriada, corada com vermelho de rutênio.



4.2 Detecção de cápsula por microscopia óptica

A observação microscópica da cápsula negativamente corada, através do método de Hiss, (Figura 7) revelou que 13 das 23 cepas analisadas possuem cápsula (54,2%) na condição estudada.

Figura 7 - Fotomicrografia de células de *P. gingivalis* W83 após coloração de Hiss, observadas sob microscópio óptico de campo claro. Aumento 1000X. O halo branco ao redor da célula bacteriana é indicativo da presença de cápsula



A cápsula foi detectada em 7 e 13 entre as 23 cepas, após cultivo em meio sólido e líquido, respectivamente. Assim, a detecção da cápsula foi mais frequente entre as amostras de *P. gingivalis* após cultivo de bactérias em meio líquido na fase de crescimento exponencial, quando comparado com o crescimento em placas de ágar sangue. Os dados sugerem que as condições ambientais podem alterar a expressão de cápsula em *P. gingivalis*. (Os dados de detecção de cápsula por microscopia óptica foram apresentados anteriormente na dissertação de mestrado de Talyta D' Epiro, ICBUSP, 2011). Assim, as amostras de *P. gingivalis* foram classificadas quanto à detecção de cápsula e fímbria, como apresentado na Tabela 2. Esses dados foram comparados aos dados obtidos nas análises de macrorestrição por PFGE, genótipo *fimA*, adesão à célula epitelial, transcrição dos genes *fimA, fimS* e *fimR,* e polimorfismo de *fimSR* e *pg2130*.

Tabela 2 - Número de cepas de *P. gingivalis* em relação à presença de fímbria detectada por microscopia eletrônica, e de cápsula detectada por microscopia óptica. Os dados sobre as cepas W83 e 33277 foram anotados isoladamente, pois estas amostras têm o seu fenótipo conhecido e foram usadas como controle.

Detecção	Cápsula +	Cápsula -	Total
Fímbria +	9	33277 + 5	15
Fímbria -	W83 + 3	4	8
Total	13	10	23

4.3 Análise do Perfil de Macrorrestrição após Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

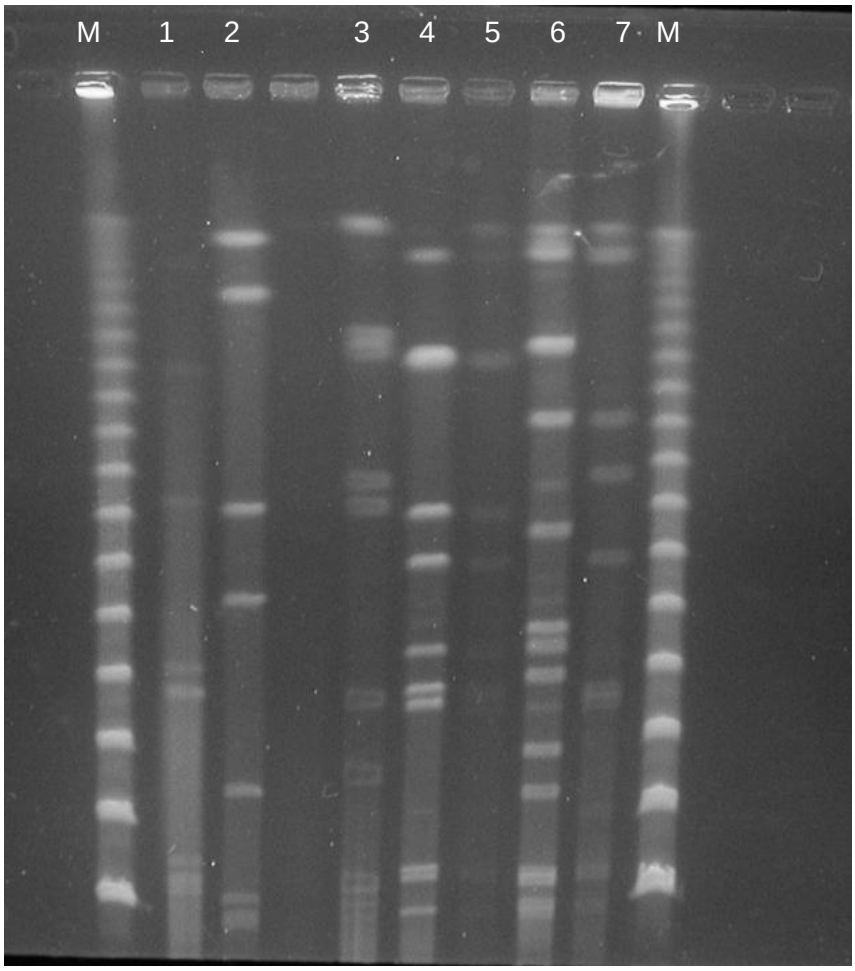
Os perfis de macrorrestrição do DNA genômico digerido com *NotI* foram avaliados por PFGE para todas as cepas estudadas. No entanto, um padrão de bandas legível foi obtido para apenas 16 cepas, apesar dos esforços contínuos. Os perfis de macrorrestrição de algumas das amostras estudadas são mostrados na Figura 8. Os padrões de bandas foram analisados utilizando o programa Bionumerics e os perfis de banda foram comparados por meio do coeficiente de similaridade de Dice. Cepas de *P. gingivalis* foram distribuídas em *clusters*, usando o método UPGMA, como mostrado no dendrograma (Figura 9), e os padrões foram comparados com o genótipo *fimA*, a presença de cápsula e fímbria e caracterização da região a montante do gene *fimS*, W83 ou 33277-*like*.

PFGE foi muito discriminatória, uma vez que apenas dois pares de linhagens foram alocadas no mesmo *cluster*, em um nível de corte de similaridade > 70%. Curiosamente as cepas W83 e 33277 foram alocadas no mesmo grupo e divergiram acentuadamente das demais cepas. Não houve correlação entre os genótipos *fimA* ou *fimS* e grupos determinados por PFGE.

Cepas capsuladas e não-capsuladas, bem como cepas fimbriadas e não fimbriadas foram distribuídas ao longo do dendrograma. No entanto, um dos ramos do dendrograma foi formado apenas por cepas capsuladas e fimbriadas.

Os dados de relação filogenética entre as cepas determinada por MLST também foram associados a diferentes variáveis e estão apresentados na Figura 10.

Figura 8 - Perfil de macrorestrição do DNA de amostras de *P. gingivalis* digeridas com *NotI*.



M - peso molecular Lambda Ladder PFGE marker, 1. 316AA, 2: W83, 3: P1604, 4: 279C1, 5: 323B1, 6: 259B1, 7: Kd289.

Figura 9 - Dendrograma representando a similaridade de 16 cepas de *P. gingivalis* determinados por análise de restrição *Not I*. Os genótipos *fimA*, a similaridade da região promotora de *fimS* com a amostra 33277 ou W83 (*33277-like* e *W83-like*, respectivamente) e a detecção de cápsula e fímbria foram incluídos para comparação.

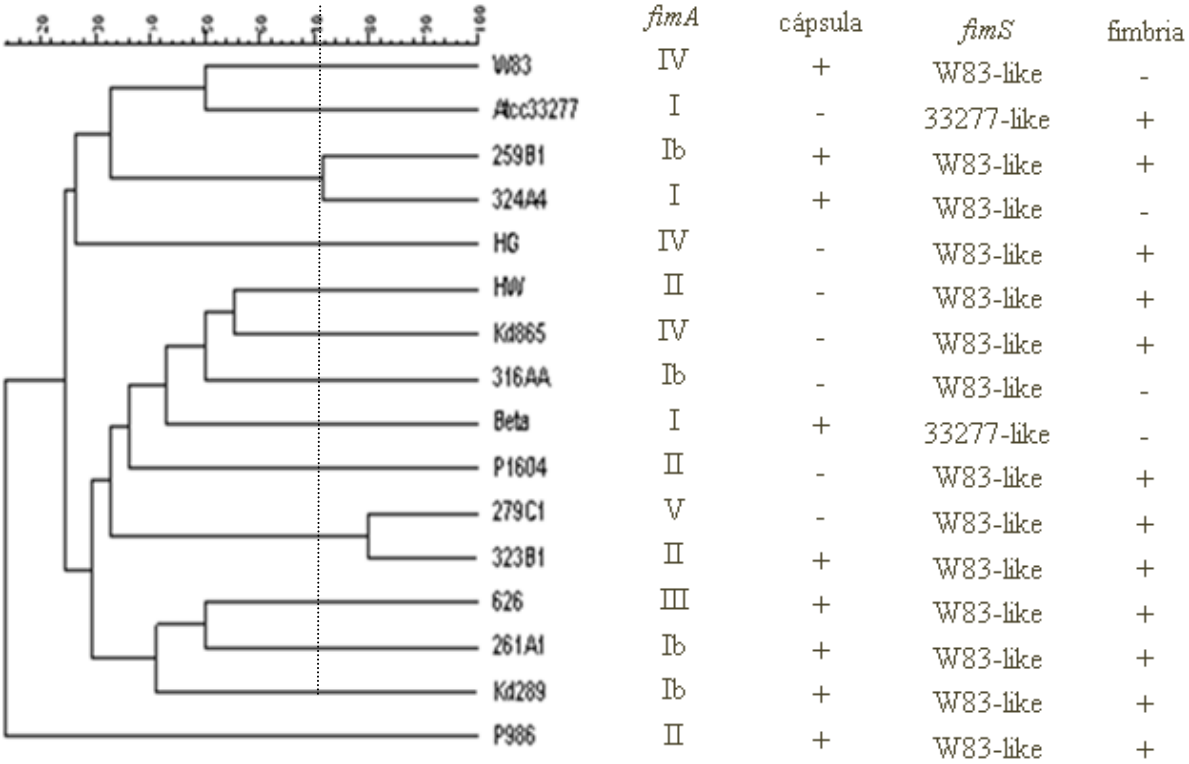
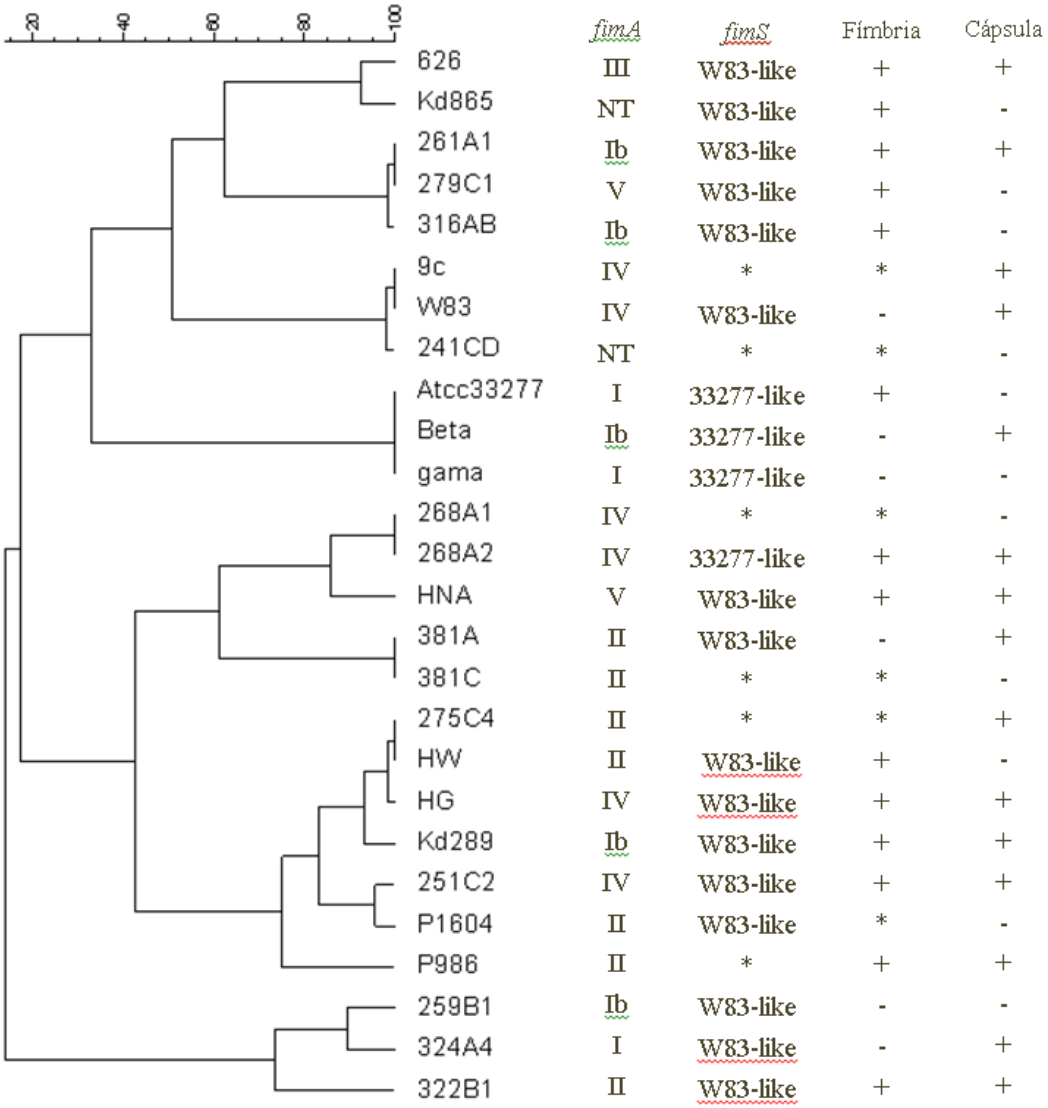


Figura 10 - Dendrograma baseado no coeficiente de similaridade DICE construído através do algorítimo UPGMA, mostrando o padrão de similaridade de 25 cepas de *P. gingivalis.* Os dados foram comparados ao genótipo *fimA*, a similaridade da região promotora de *fimS* e a detecção de cápsula e fímbria.



* dados não obtidos

4.4 Análise da seqüência da região *fimS* / *fimR*

4.4.1 Detecção de fimR por amplificação

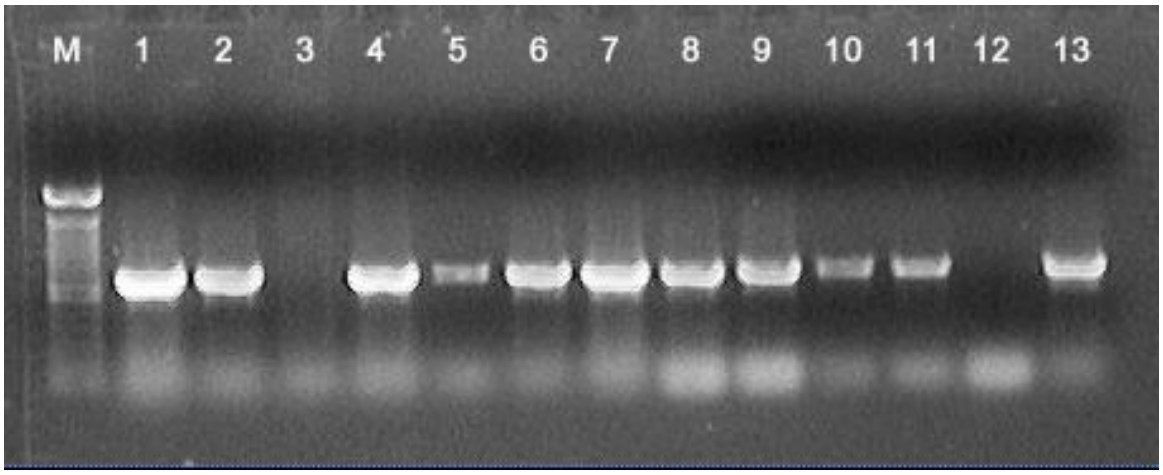
O gene *fimR* foi detectado por PCR em todas as cepas estudadas. Esta análise foi utilizada como controle, uma vez que que *fimR* apresenta homologia de

100% em ambas as cepas 33277 e W83 (como demonstrado no genoma completo dessas cepas, AP009380.1 e AE015924.1, respectivamente).

4.4.2 Análise do polimorfismo da região promotora de fimS

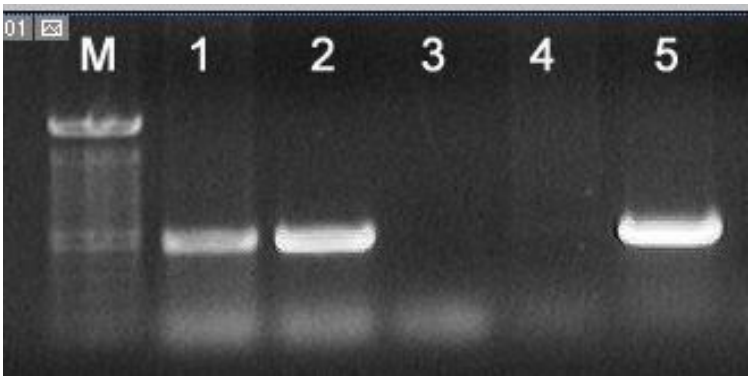
A região promotora do gene *fimS* homóloga a W83 foi detectada em 18 cepas clínicas e a homóloga a 33277 foi detectada em 3 cepas clínicas (Figuras 11 e 12, respectivamente).

Figura 11 - Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio onde os produtos de amplificação relativos a região promotora do gene *fimS* homóloga a W83, foram submetidos a corrida eletroforética em tampão TAE.



Em M: marcador de peso molecular 1Kb. Produtos de amplificação utilizando DNA molde de diferentes amostras de *P. gingivalis*. Em 1: 279C1, 2: 1381A, 3: beta, 4: HW, 5: 259C3, 6: 251C2, 7: 324A4, 8: HNA, 9: HG, 10: 279C1, 11: 322B2, 12: controle negativo, 13: controle positivo (W83) (732 pb).

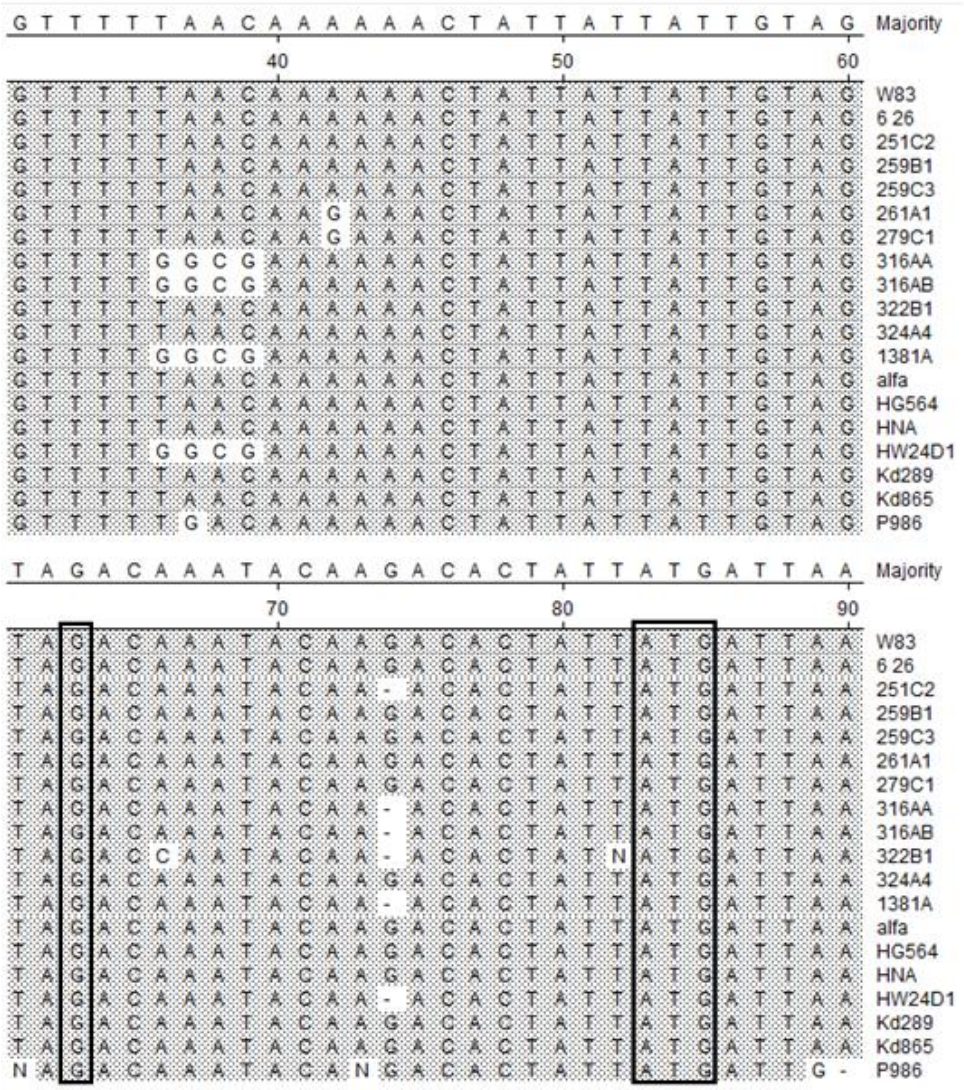
Figura 12 - Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio onde os amplicons (573 pb) relativos a região promotora do gene *fimS* homóloga a 33277 foram submetidos a corrida eletroforética em tampão TAE.



M: marcador de peso molecular 1Kb, 1: beta, 2: 268A2, 3: W83, 4: controle negativo, 5: controle positivo (33277)

Após purificação e sequenciamento tal como descrito na seção 3.5.3, as sequências foram alinhadas com as sequências das cepas de referência W83 ou 33277 por ClustalW usando o programa MegAlign do pacote DNAstar. Duas das 17 cepas, das quais as reações resultaram em um produto em PCR com iniciadores para W83, não mostraram uma sequência apropriada para a análise. Assim 15 sequências de cepas clínicas foram alinhadas com a região a montante de *fimS* da cepa W83, e três com a cepa 33277, como mostrado nas Figuras 13 e 14. A alta homologia com as cepas de referência permitiu-nos designar as cepas descritas na Figura 10 como *fimS W83- like*, e aquelas na Figura 11 como *fimS 33277- like*.

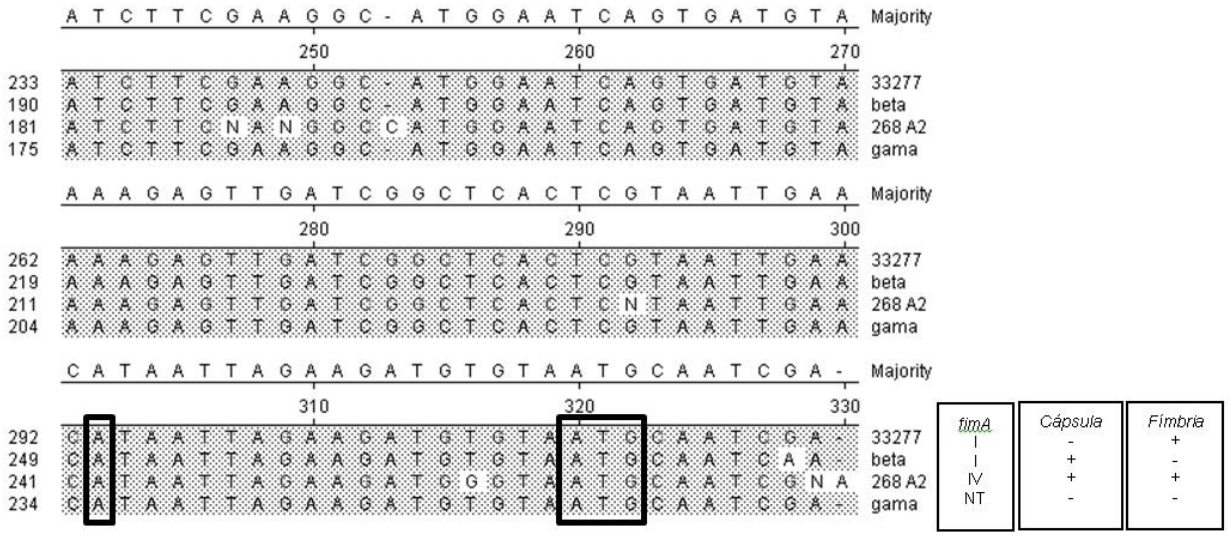
Figura 13 - Alinhamento das sequências da região promotora do gene *fimS* das cepas que amplificaram com os iniciadores para W83. A região sugestiva de -10, o códon de iniciação de transcrição estão destacados nas caixas e os dados referentes ao genótipo *fimA* e presença da cápsula e fímbria estão apresentados.



genótipo fimA	Cápsula	Fímbria
IV	+	-
III	+	+
IV	+	+
Ib	-	-
V	+	+
Ib	+	+
V	-	+
II	+	+
I	-	+
II	+	+
I	+	-
II	-	+
NT	-	-
IV	+	+
V	+	-
II	-	+
Ib	+	+
NT	-	+
II	+	+

NT – não tipável.

Figura 14 - Alinhamento das sequências da região promotora do gene *fimS* das cepas que amplificaram com os iniciadores para 33277. A região sugestiva de -10, o códon de iniciação de transcrição estão destacados nas caixas e os dados referentes ao genótipo *fimA* e presença da cápsula e fímbria estão apresentados.

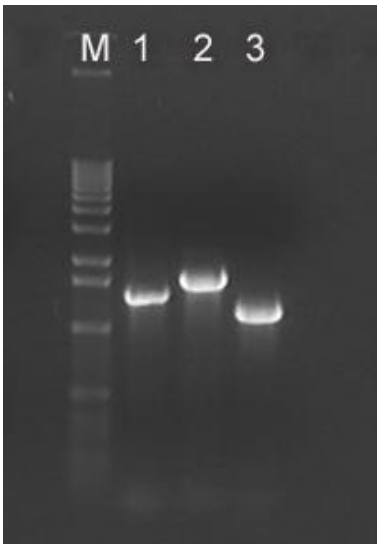


NT – não tipável.

4.4.3 Análise da sequência da região fimS / fimR

Uma sequência de 2.092 pb incluindo parte do gene *fimS* (que codifica a proteína histidina quinase), a região intergênica, o gene *fimR* (regulador de resposta) e uma região de 600 pb a juzante de *fimR* foi avaliada em 6 cepas escolhidas aleatoriamente. Estas amostras incluíram 3 fimbriadas (279C1, 33277 e 6/26) e 3 não-fimbriadas (W83, beta e 324A4). A região foi amplificada em três reações de amplificação. A Figura 15 mostra um gel de agarose com os três fragmentos após amplificação utilizando DNA molde da cepa 33277.

Figura 15 - Fotografia de um gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Amplicons foram submetidos a eletroforese em tampão TAE.



Em 1.amplicom de 1.434 pb (iniciadores fimS upper 2 - fimR lower), em 2. amplicom de 1.710 pb (iniciadores fimS upper - fimR lower 2) e em 3. amplicom de 1.213 pb (iniciadores fimS upper3-fimR lower 2). M: marcador de peso molecular 1Kb.

As sequências obtidas foram alinhadas com base nas sequências conhecidas de 33277 e W83. A seguir, estas sequências foram utilizadas para determinar a sequência de aminoácidos das proteínas codificadas, e estas alinhadas utilizando o programa MegAlign, do pacote DNAstar. A Figura 16 mostra o alinhamento destas sequências em que algumas alterações de aminoácidos foram detectadas. A localização dos domínios conservados em *fimR* é mostrada na Figura 17.

Não houve diferença significativa entre as sequências. Polimorfismos em regiões mostradas em verde e azul (Figura 16) estão dentro de REC (Figura 17), mas não estão situados no sítio ativo. Os polimorfismos mostrados na cor vermelha e amarelo (Figura 16) estão localizados na região de ligação do DNA (Figura 17), sugerindo que as sequências de reconhecimento pode variar em FimR. Assim, os dados sugerem que FimR estaria funcional em todas as cepas estudadas.

Figura 16 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da região do gene *fimR.* As regiões coloridas correspondem ao polimorfismo em FimR, e os seus correspondentes em *fim*R são mostrados na Figura 17.

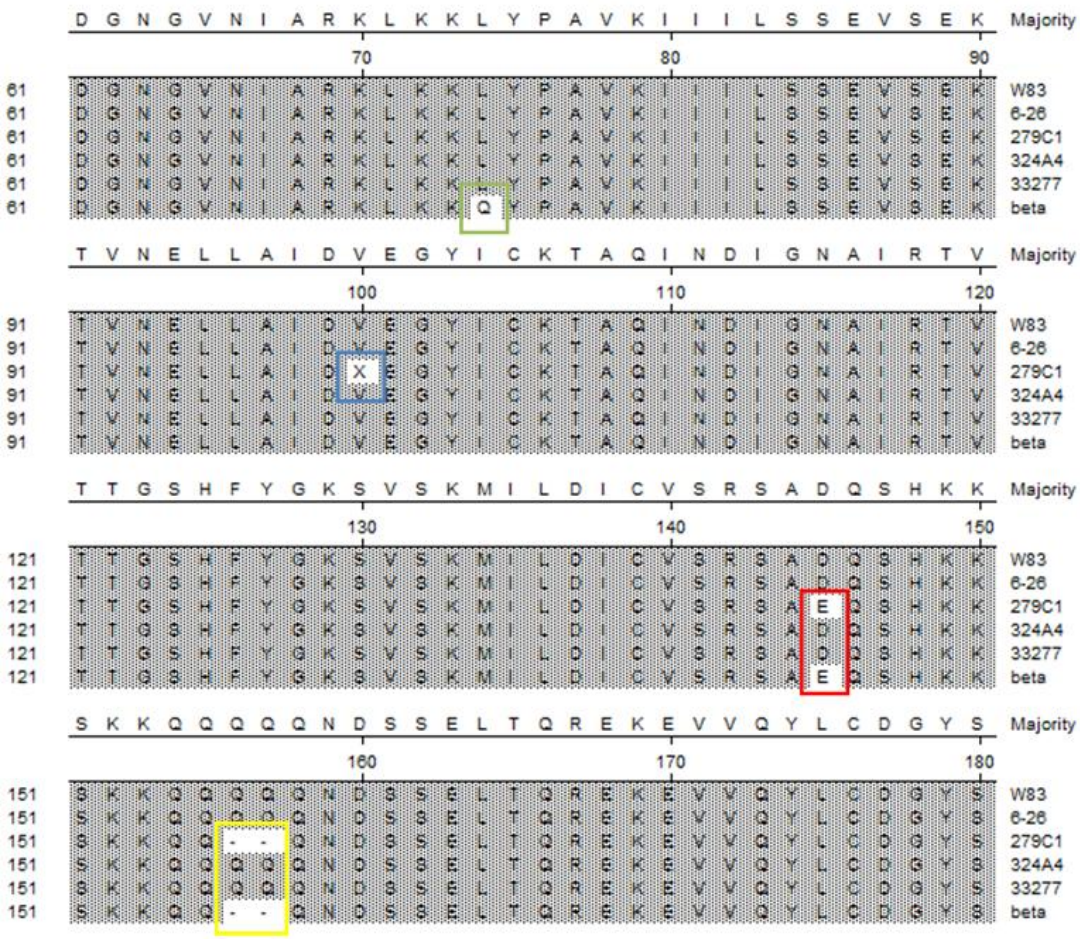
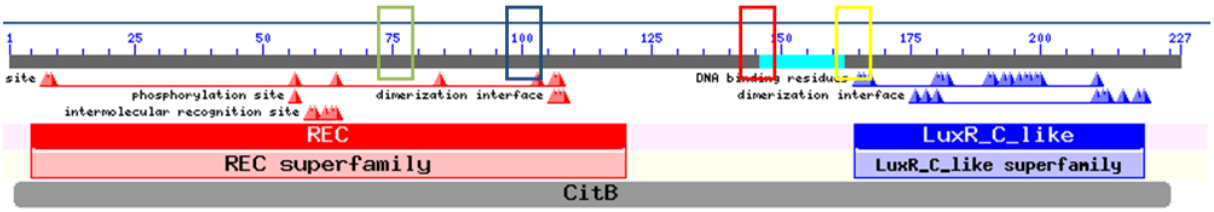


Figura 17 - Domínios conservados de FimR. As regiões polimórficas entre as cepas de *P. gingivalis* estão mostradas em quadrados coloridos, cujas cores correspondem às regiões mostradas na Figura 16.



No artigo de Nishikawa et al., 2010, é proposto que a cepa W83 não produz fímbria devido a uma alteração na região codificadora do domínio quinase de *fimS* como demonstrado na Figura 18.

Figura 18 - Região codificadora do domínio quinase de *fimS*

```
②
  593 G  S  G  L  G  L  I  I  C  K  G  L  L  K  K  N ↓K  S  K  L  C  I  D  S  K  E  G   619
327:  GGTAGCGGATTAGGTTTAATTATCTGCAAAGGTCTGCTCAAAAAAAA-CAAAAGCAAGTTATGCATTGACAGCAAGGAAGGT
W83:  GGTAGCGGATTAGGTTTAATTATCTGCAAAGGTCTGCTCAAAAAAAAACAAAAGCAAGTTATGCATTGAcagcaaggaaggt
  600 G  S  G  L  G  L  I  I  C  K  G  L  L  K  K  K  Q  K  Q  V  M  H  *              621

  620 K  G  S  V  F  S  F  V  L  A  S  A  *      FimR  M  I  S  I  V  L  V  D  D
327:  AAAGGCTCCGTATTCTCTTTTGTCCTTGCCTCAGCGTAAagattacacaatATGATTAGTATCGTACTCGTGGATGAC 1935
W83:  aaaggctccgtattctcttttgtccttgcctcagcgtaaagattacacaatATGATTAGTATCGTACTCGTGGATGAC 1957
                                          FimR  M  I  S  I  V  L  V  D  D
```

Fonte: Nishikawa et al, 2010

Fizemos a análise dessa região com as amostras estudadas, e pudemos determinar que essa inserção é um evento exclusivo da cepa W83. As demais cepas não fimbriadas (324A4, beta, HNA, 259B1 e gama) não a possuem.

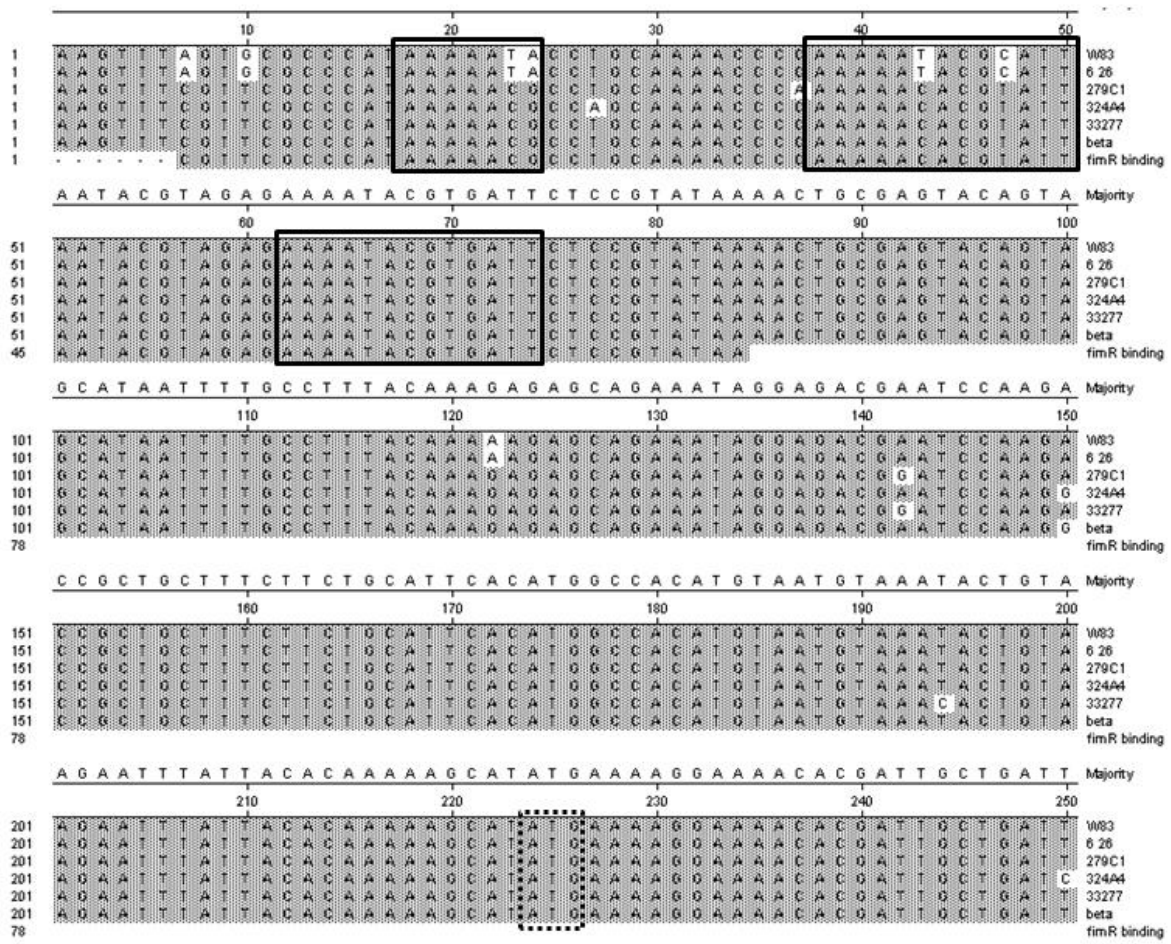
Figura 19 - Alinhamento das sequências da região onde há a inserção de uma adenina na cepa W83.

```
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   beta
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   626
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   259B1
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   268A2
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   279C1
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   323B1
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   324A4
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   33277
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A A C A A A A G C A A G T T A T G C A T   W83
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   gama
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   HNA
C T G A A A G G T C T G C A A A A A A A A - C A A A A G C A A G T T A T G C A T   P1604
```

4.4.4 Análise da sequência da região promotora do gene *pg2130*

Pela cascata de regulação da expressão do gene *fimA* (Figura 1), *fimR* se liga na região promotora do gene *pg2130* (NISHIKAWA et al., 2004). Para esta análise, utilizamos as mesmas amostras nas quais foi analisada a sequência da região *fimS/fimR* (seção 4.4.3). Os dados sobre a sequência da região promotora de *pg2130* estão apresentados na Figura 20. Observa-se que as cepas não fimbriadas W83 e 626 apresentam diferenças nas sequências repetidas, possivelmente alterando a ligação de *fimR*, e a regulação da transcrição.

Figura 20 - Alinhamento das sequências do gene *pg2130* das cepas de *P. gingivalis*.



O sítio de iniciação está marcado em linhas pontilhadas. A região de ligação de FimR está apresentada na última sequência (*fimR binding site*). As regiões de repetições diretas estão apresentadas nas caixas com linha contínua.

4.5 Transcrição relativa de *fimA, fimS* e *fimR* em diferentes condições ambientais

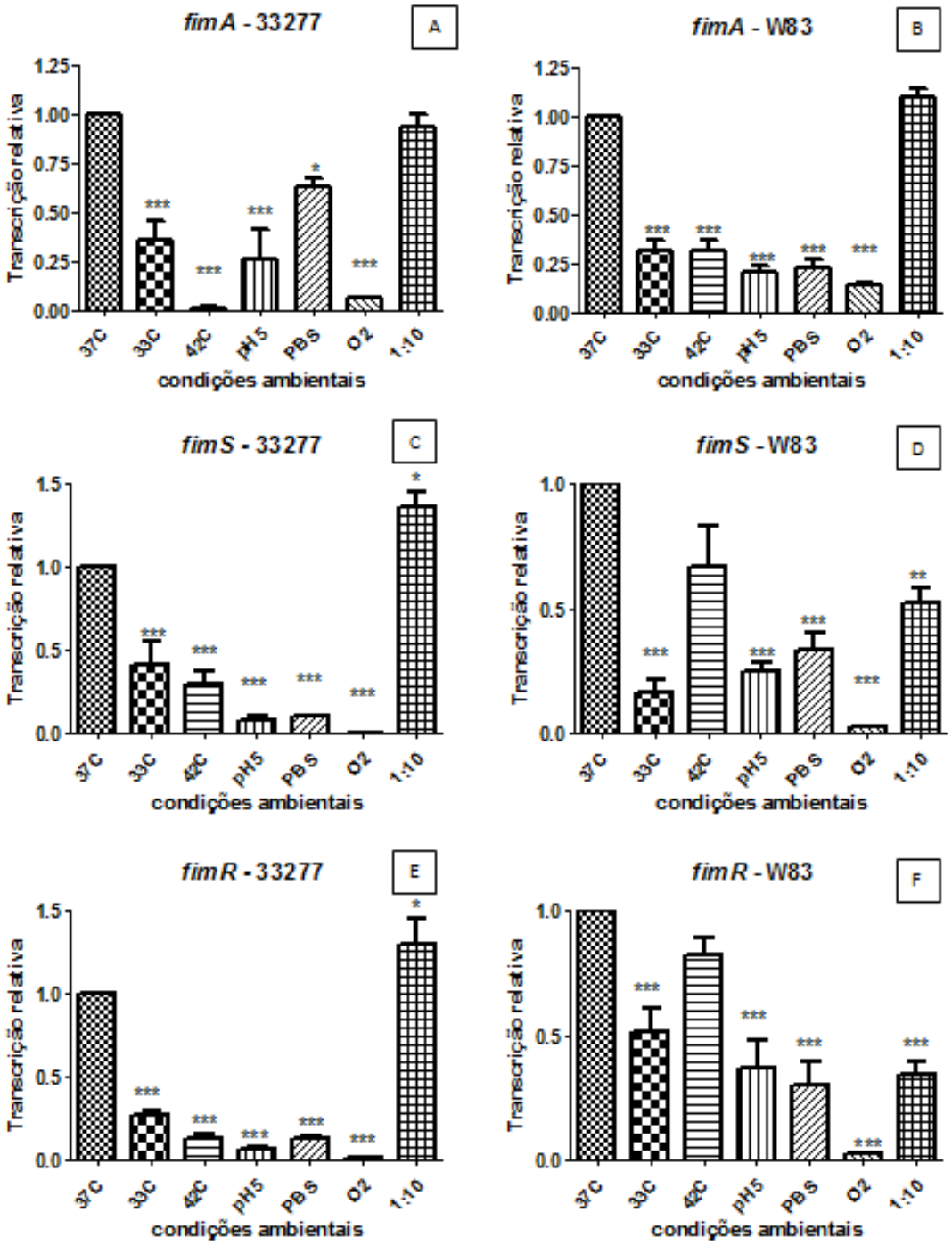
Os níveis de transcrição relativa em diferentes condições ambientais foram determinados para as amostras de referência W83 e 33277. Os dados de transcrição relativa foram expressos após normalização frente à transcrição do gene de referência *16SrRNA*.

Os dados indicaram que os níveis de transcritos de *fimA,* em W83 foram muito menores do que aqueles observados em 33277 na condição controle (cerca de 100 vezes menor), tendo como parâmetro a transcrição do gene controle

16SrRNA. Estes dados sugerem ausência de expressão da fímbria, em qualquer uma das condições estudadas em W83, enquanto que a transcrição dos genes *fimS* e *fimR* foi apenas 2 vezes menor em W83 quando comparada a 33277.

A análise da transcrição gênica foi então normalizada para 1,0 na condição controle para cada cepa (incubação em meio TSBHK, a 37 ^{o}C) e a transcrição relativa determinada para cada condição ambiental em relação aos níveis observados para a condição controle. A transcrição de *fimA* nas cepas 33277 e W83 foi regulada negativamente em todas as condições estudadas, com exceção de baixa osmolaridade (Figuras 21 A e B) (ANOVA, Tukey). Apesar de não alterar a transcrição de *fimA* em 33277, a baixa osmolaridade regulou positivamente *fimS* e *fimR*, enquanto as demais condições induziram regulação negativa da transcrição destes genes (Figuras 20 C e E). Por outro lado, em W83, houve regulação negativa da transcrição de *fimS* e *fimR* também em baixa osmolaridade, enquanto a incubação a 42 ^{o}C não afetou o nível destes transcritos em relação ao controle (Figuras 21 D e F).

Figura 21 - Níveis de transcrição dos genes *fimA, fimS* e *fimR* observados em 33277 e W83 sob diferentes condições ambientais em relação à condição controle (TSBHK a 37 °C).

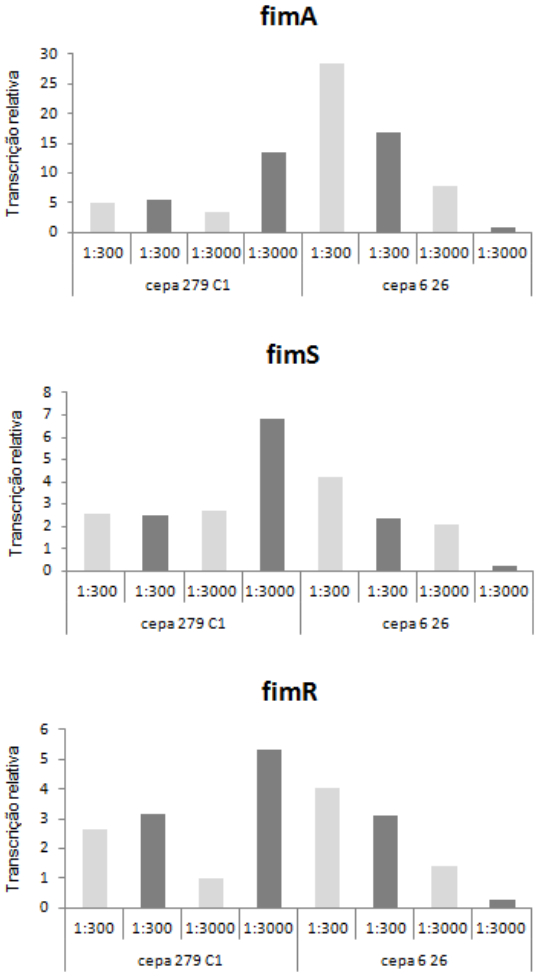


*p<0.05. ***p<0.001 (ANOVA, Tukey)

4.6 Ensaio de Adesão a células epiteliais - efeito da Multiplicidade de Infecção (MOI) sobre a transcrição gênica

O efeito da MOI sobre a transcrição gênica relativa de *fimA, fimS* e *fimR* foi analisado em ensaio de adesão a células epiteliais. Neste ensaio foram avaliadas células de *P. gingivalis* classificadas como fimbriadas de duas cepas distintas (amostras 279C1 e 6/26) empregadas em interação com células epiteliais OBA-9 nas MOI: 1:300 e 1:3.000 (célula eucarionte:bactéria). A Figura 22 apresenta os dados de transcrição relativa dos genes *fimA, fimS e fimR* nas amostras em duas condições: controle (sem interação com a célula epitelial) e após a interação, utilizando as duas diferentes MOI.

Figura 22 - Transcrição relativa de *fimA, fimS* e *fimR* nas condições controle (coluna clara) e após contato com a célula epitelial (coluna escura) com MOI 1:300 e 1:3000.



Os dados revelaram comportamento distinto entre as cepas. A cepa 279C1, apresentou tendência de regulação positiva dos três genes testados (*fimA, fimS* e *fimR*) após aderência a célula epitelial na MOI 1:300, e estas diferenças foram observadas quando empregada a MOI 1:3.000. Por outro lado, a interação com célula epitelial resultou em regulação negativa para os três genes testados na cepa 6/26, em ambas as MOI empregadas. Deve ser salientado que também no controle foram empregadas diferentes concentrações de bactérias. Assim outros fatores como *quorum sensing,* que iriam influenciar a expressão gênica em alta ou baixa MOI, foram padronizados no controle. Sendo assim, optamos por utilizar a MOI 1:3.000 nos experimentos de interação, visto que esta promoveu diferenças mais evidentes em relação ao controle para a cepa 279C1.

4.7 Ensaio de adesão

O ensaio foi realizado com todas as cepas utilizando a MOI 1:3.000. Todas as cepas foram capazes de aderir à célula epitelial gengival, independentemente da presença de fímbria (Figura 23) não havendo diferenças estatisticamente significantes em relação à eficiência de adesão (% de adesão em relação ao inóculo inicial) entre cepas fimbriadas e não fimbriadas (Tabela 3).

Figura 23 - Eficiência de adesão de cepas de *P. gingivalis* à célula epitelial (média e desvio padrão de um ensaio em triplicata em três experimentos independentes)

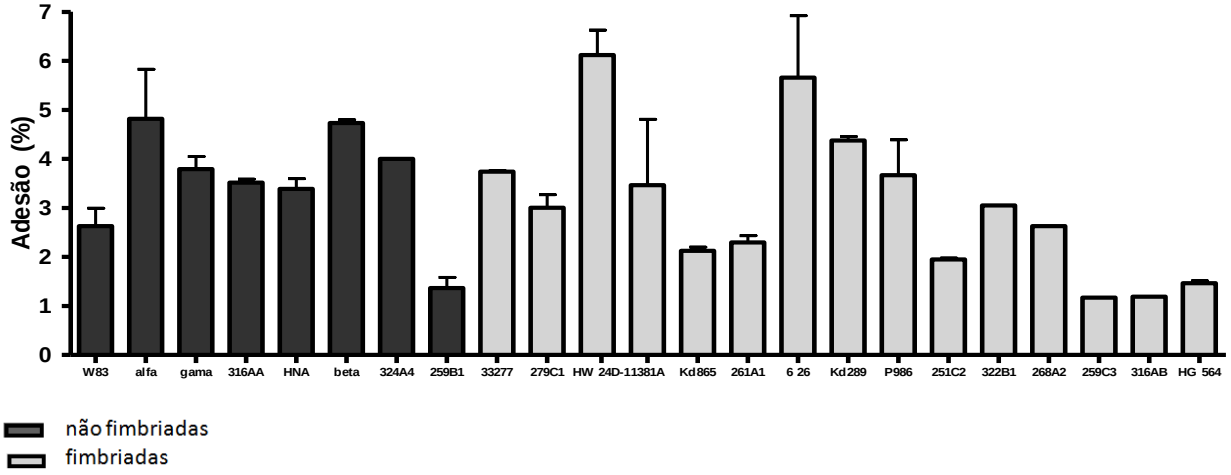


Tabela 3 - Valores de média e desvio padrão da porcentagem de adesão à célula epitelial de amostras de *P. gingivalis* fimbriadas e não fimbriadas.

Amostra	Média	± Desvio Padrão
fimbriadas	3,06	±1,50
não fimbriadas	3,53	±1,13

4.8 Transcrição relativa de *fimA, fimS* e *fimR* após interação com células epiteliais

Os níveis de transcrição de genes foram normalizados com controle endógeno (*16SrRNA*), e expressos em relação aos observados para a cepa de referência 33277 na condição controle (sem contato com a célula epitelial).

Dados de transcrição de *fimA, fimS* e *fimR* para cepas fimbriadas e não fimbriadas estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. A transcrição de *fimA* em níveis semelhantes aos observados para a cepa de referência 33277 não parece ser uma característica comum entre as cepas de *P. gingivalis*. Após incubação *in vitro,* apenas sete cepas (quatro fimbriadas e três não fimbriadas) exibiram níveis de mRNA de *fimA* semelhantes ou superiores a 33277 (transcrição relativa de *fimA* acima de 0,8). A adesão a células epiteliais gengivais foi capaz de regular positivamente a transcrição de *fimA* na cepa 33277, em 6 de 13 cepas clínicas fimbriadas e em 5 de 9 cepas classificadas como não fimbriados, incluindo a W83, embora os níveis de transcrição de *fimA* ainda sejam muito baixos em algumas cepas, quando comparados aos de 33277.

É interessante notar também que as duas cepas classificadas como fimbriadas com menor taxa de adesão a células epiteliais (eficiência em cerca de 1%), cepas 316AB e 259C3 (genótipos *fimA* I e Ib, respectivamente), não apresentam níveis detectáveis de transcritos de *fimA* na situação controle ou após a adesão às células epiteliais. O genótipo I é caracterizado pelas fímbrias longas, altamente eficientes na adesão a células epiteliais, como ocorre com 33277. Assim,

consideramos possível que as fímbrias visualizadas por MET nestas amostras não sejam associadas a FimA, mas codificadas em outra região.

Por outro lado, foi possível detectar a transcrição de *fimA* maior que 33277 em três das amostras classificadas como não fimbriadas. Deve-se ressaltar que a visualização das fímbrias por MET não foi feita nas culturas sob as mesmas condições empregadas para a análise de eficiência de adesão e de transcrição, devido a motivos técnicos descritos anteriormente (fragilidade das fímbrias em meio líquido). Mas, os dados sugerem que estas cepas não fimbriadas nas quais ocorre transcrição de *fimA,* devem apresentar outras alterações no seu genoma que impeça a montagem da fímbria.

A transcrição de *fimS* e *fimR* não foi homogênea entre as cepas. Esses genes apresentaram baixos níveis de transcritos em relação a 33277 na maioria das cepas, e sua regulação não foi necessariamente correlacionada com a regulação da transcrição de *fimA*.

Dados anteriores haviam mostrado que o sistema de dois componentes FimS-FimR é operacional em toda as fases de crescimento e regulam positivamente *fimA* em 33277 (NISHIKAWA et al., 2004). No entanto, os dados obtidos neste estudo sugeriram que esse sistema pode não regular *fimA* da mesma maneira em todas as cepas de *P. gingivalis*.

Tabela 4 - Eficiência de adesão (%), genótipo *fimA* e transcrição relativa de *fimA, fimS* e *fimR* na condição controle e após interação com célula epitelial (dados em relação a transcrição em 33277 na condição controle), em cepas de *P. gingivalis* classificados como fimbriados.

Cepas fimbriadas								
	Adesão (%)	**genótipo *fimA***	**Transcrição relativa**					
			fimA		***fimS***		***fimR***	
			controle	adesão	controle	adesão	controle	adesão
33277	3,74	I	1	1,72	1	0.68	1	1.20
6 26	5,66	III	0,44	0,49	0,02	0,21	0,03	0,12
Kd289	4,38	Ib	0,15	1,33	0,41	0,46	0,11	0,14
316AB	1,19	I	0,01	0,01	0,1	0,73	0,02	0,08
P986	3,67	II	0,69	0,47	0,8	1,08	0,18	1,19
251C2	1,95	IV	1,12	0,36	0,04	0,13	0	0,03
261A1	2,3	Ib	0,54	0,76	0,65	1,26	0,77	0,47
HW	6,12	II	0,83	1,08	0,89	0,38	1,66	0,11
Kd865	2,13	NT	0,11	0,1	0,19	0,57	0,04	0,12
279C1	3	V	2,84	3,42	1,46	2,45	0,63	4,21
1381A	3,47	II	0,04	0,23	0,02	0,27	0,004	0,05
259C3	1,17	Ib	0	0,03	0,01	0,04	0,02	0,04
HG	1,45	IV	1,15	0,5	0,05	0,15	0,15	0,18
323 B1	3,05	II	0,14	0,12	0,10	0,08	0,01	0,01
média	3,09		0,65	0,76	0,41	0,63	0,33	0,55
desvio padrão	1,55		0,76	0,92	0,47	0,66	0,50	1,12

Tabela 5 - Eficiência de adesão (%), genótipo *fimA* e transcrição relativa de *fimA, fimS* e *fimR* na condição controle e após interação com célula epitelial (dados em relação a transcrição em 33277 na condição controle), em cepas de *P. gingivalis* classificados como não fimbriados.

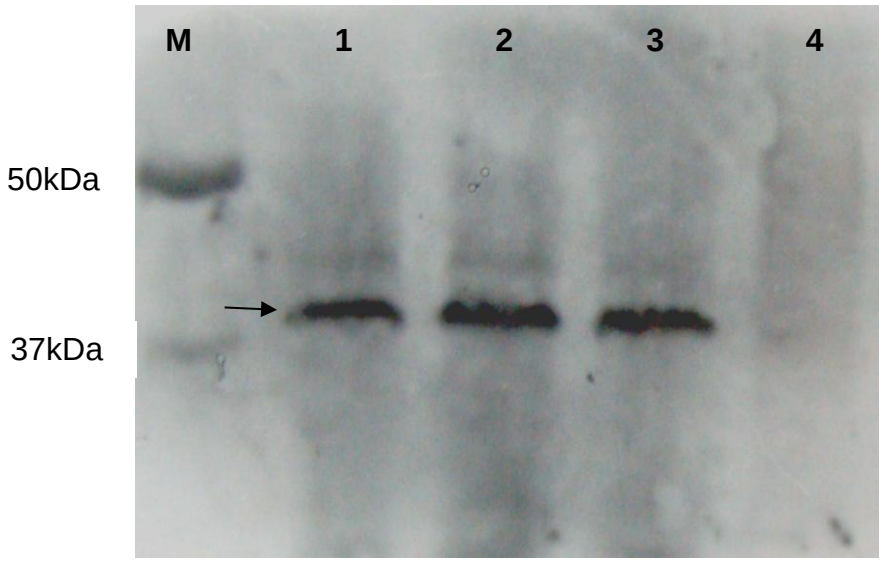
Cepas não fimbriadas								
		genótipo	**Transcrição relativa**					
	Adesão (%)	***fimA***	***fimA***		***fimS***		***fimR***	
			controle	adesão	controle	adesão	controle	adesão
W83	2,63	IV	0,02	0,16	0,15	0,6	0,08	0,37
Beta	4,73	I	1,28	0,2	0,29	0,06	0,27	0,1
316AA	3,52	Ib	0,36	0,6	0,12	0,16	0,14	0,36
Gama	3,79	I	1,94	2,86	0,04	0,19	0,08	0,18
Alfa	4,82	NT	0,05	0,41	0,04	0,23	0,07	0.58
HNA	3,39	V	0,06	0,01	0,06	0	0,01	0,02
324A4	4	I	0,05	0,02	0,71	0,02	0,15	0,01
251C2	1,95	IV	1,12	0,36	0,04	0,13	0	0,03
259B1	1,2	Ib	0,02	0,05	0,09	0,31	0,02	0,04
média	3,34		0,54	0,52	0,17	0,19	0,09	0,14
desvio padrão	1,22		0,72	0,90	0,22	0,18	0,09	0,15

4.9 Western Blot

Lisados de células bacterianas obtidas nas mesmas condições utilizadas para detecção de fímbrias por MET foram submetidos a corrida eletroforética, e a presença de fímbria detectada por reação como soro anti os peptídeos sintéticos de FimA. Devido à alta semelhança entre os peptídeos sintéticos P1 (FimA I) e P2 (FimA II e III), soros obtidos pela inoculação de quaisquer um dos dois peptídeos reagiram para as amostras com genótipos *fimA* I, II e III. Assim, optamos por utilizar um único soro para a análise das amostras destes genótipos. O soro obtido com o peptídeo P3 (FimA IV) não apresentou uma boa reação durante o ensaio de Western-Blot, sendo assim optamos pela utilização do anticorpo anti-FimA IV, gentilmente cedido pelo Dr. Kyioshi Nishikawa.

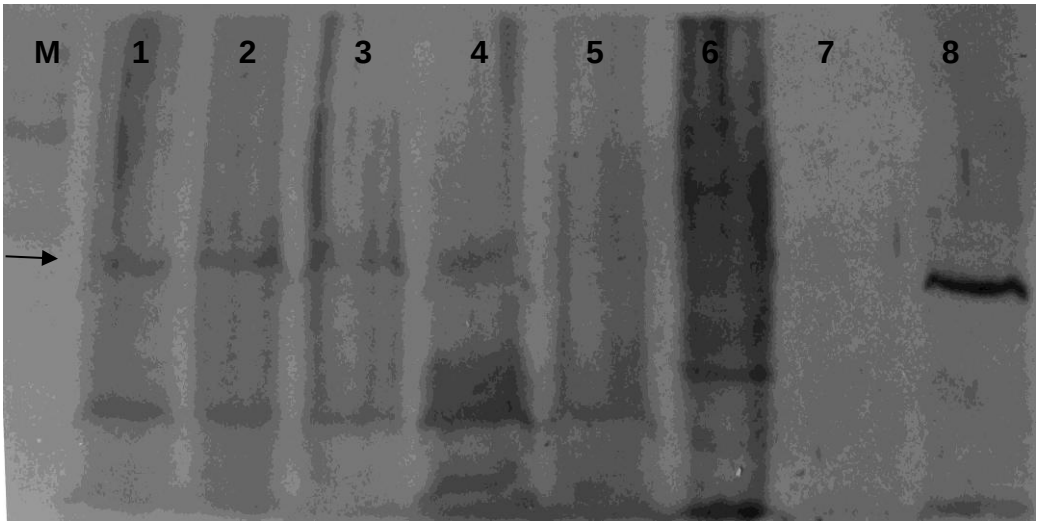
Nas Figuras 24 e 25 é possível verificar a presença da proteína de ~ 40 KDa, correspondendo ao monômero de FimA.

Figura 24 - Foto ilustrativa do filme radiográfico onde foi detectada a presença do monômero de FimA utilizando o anticorpo anti-fimA IV em lisados de amostras *de P. gingivalis*.



Em M: Peso Molecular Precision Plus Protein. Nas canaletas 1: amostra HG564, 2: amostra 268A2, 3: amostra 251C2, 4: amostra W83. A seta indica a presença da proteína de ~ 40 Kda, correspondendo ao monômero de FimA.

Figura 25 - Foto ilustrativa do filme radiográfico onde foi detectada a presença do monômero de FimA utilizando o anticorpo anti-fimA I.



Em M: Peso Molecular Precision Plus Protein. Nas canaletas 1: amostra HW, 2: amostra 261A1, 3: amostra 1381A, 4: amostra 6/26, 5: amostra 259B1, 6: amostra alfa, 7: 324A4, 8: amostra beta. A seta indica a presença da proteína de ~ 40 Kda, correspondendo ao monômero de FimA.

A Tabela 6 apresenta um quadro comparativo entre os resultados obtidos por Western-blot e MET. Verificamos que duas amostras apresentaram a proteína FimA no ensaio de Western sendo que não foi possível a visualização da fímbria por MET. Por outro lado, a cepa 323B1, apesar de ser classificada como fimbriada por MET, não reagiu ao anticorpo anti-FimA.

Tabela 6 - Amostras analisadas quanto à presença da proteína FimA por Western-Blot (I ou IV representam a reação com o anticorpo anti-fimA I ou anti-fimA IV) e presença de fímbrias por MET, e o genótipo *fimA* da cepa.

	Western-blot	**MET**	***fimA***
279C1	+ (I)	+	V
261A1	+ (I)	+	Ib
33277	+ (I)	+	I
W83	- (IV)	-	IV
1381A	+ (I)	+	II
Kd865	+ (I)	+	NT
beta	+ (I)	-	I
HW	+ (I)	+	II
HNA	+ (I)	-	V
6 26	+ (I)	+	III
251C2	+ (IV)	+	IV
259B1	- (I)	-	Ib
324A4	- (I)	-	I
323B1	- (I)	+	II
316AB	+ (I)	+	I
Kd289	+ (I)	+	Ib
P986	+ (I)	+	II
259C3	+ (IV)	+	IV
268A2	+ (IV)	+	IV
alfa	- (I)	-	NT
gama	- (I)	-	I
316AA	- (I)	-	Ib
HG	+ (IV)	+	IV

5 DISCUSSÃO

Uma das principais características de organismos que vivem na cavidade oral é a capacidade de aderir a uma variedade de superfícies, uma vez que este aspecto é crítico para a sua manutenção no ambiente com fluxo constante, seja da saliva ou do fluido gengival. As fímbrias figuram entre as principais estratégias de *P. gingivalis para* a colonização da cavidade oral por participarem na interação da bactéria com a célula epitelial (SOJAR; SHARMA; GENCO, 2002) e a outras bactérias orais, tais como *Treponema denticola* (HASHIMOTO et al., 2003) e *Streptococcus oralis* (MAEDA et al., 2004).

Poucos estudos têm analisado a capacidade colonizadora de cepas clínicas de *P. gingivalis*. A cepa 33277, fimbriada, genótipo *fimA* I, é capaz de aderir e invadir células epiteliais (UMEDA et al., 2006), em processo mediado por FimA, uma vez que um mutante deficiente em *fimA* não foi invasivo (WEINBERG et al., 1997). Apesar desta cepa apresentar um menor potencial patogênico em modelo animal experimental de abscesso, induzindo apenas abscessos localizados após inoculação no subcutâneo (GRENIER et al., 2001), a sua capacidade de induzir reabsorção alveolar em modelos experimentais de infecção oral é maior do que das cepas não fimbriadas (WANG et al 2009).

A importância da fímbria de *P. gingivalis* no processo de internalização em células não fagocíticas pode também ser demonstrada pela observação de que a cepa W83, *fimA* IV, não fimbriada, é minimamente invasiva em células epiteliais, apesar desta induzir a formação de abscessos difusos em modelos experimentais (GRENIER; MAYRAND, 1987), possivelmente devido à produção de cápsula (NEIDERS et al., 1989).

Não somente a expressão da fímbria, mas sua composição interfere na capacidade invasiva, pois a substituição do gene *fimA* II por *fimA* de outro genótipo reduziu a capacidade invasiva da amostra selvagem (KATO et al., 2007). O genótipo *fimA* também pode influenciar na patogênese e tem sido relacionado com diferenças na indução da inflamação em tecidos periodontais (HAROKOPAKIS et al., 2006). A maioria das cepas de periodontite crônica são classificadas como *fimA* II (MISSAILIDIS et al., 2004), mas outros dados mostraram que o genótipo IV é mais associado com a severidade da doença (TEIXEIRA et al., 2009). Além disso, genótipos *fimA* II e *fimA* IV foram os mais

prevalentes em lesões endodônticas sintomáticas, enquanto o genótipo *fimA* I foi mais prevalente em lesões sintomáticas (WANG et al., 2010).

Os estudos sobre fímbrias em *P. gingivalis* restringem-se a algumas poucas cepas de referência, principalmente à cepa 33277 (NISHIKAWA et al., 2004, NISHIKAWA et al., 2010; XIE; KOZLOVA; LAMONT, 2004). Assim, apesar das evidências da importância de fímbrias nesta espécie, pouco se conhece sobre a freqüência da expressão das fímbrias, os mecanismos que regulam a transcrição de *fimA* e sua expressão ou os marcadores genéticos que determinam a produção de fímbrias em isolados clínicos de *P. gingivalis*.

Os dados obtidos no presente estudo mostraram que a maioria das cepas de *P. gingivalis* é capaz de produzir fímbria (15 entre 23 amostras eram fimbriadas, Tabela 2 - MET), ao contrário da cepa amplamente estudada W83. Por outro lado, também a presença de cápsula foi bastante prevalente entre as amostras fimbriada (9 entre 23 amostras eram fimbriadas e capsuladas) (Tabela 2), diferindo da cepa fimbriada de referência 33277, que não expressa a cápsula. Estas observações sugerem que fímbrias e cápsula são importantes fatores de colonização da cavidade oral por *P. gingivalis*.

Com base nestas observações, levantamos a questão: seriam as amostras fimbriadas restritas a apenas um grupo, resultado de grandes recombinações, ou restritas a uma linhagem filogenética?

Foram realizadas análises dos perfis de macrorrestrição (PFGE) e determinada a estrutura populacional por análise de sequências de genes housekeeping (MLST) nas amostras estudadas. A natureza panmítica da população de *P. gingivalis* foi confirmada por análise do dendrograma obtido após restrição com a enzima *NotI* em 16 amostras e na análise filogenética determinada por MLST.

Os dados indicaram que a presença de fímbrias não se restringiu a um subgrupo determinado por PFGE (Figura 10). Em outro estudo realizado neste laboratório (D´EPIRO, 2011) pudemos observar que a presença de cápsula não se relacionou à linhagem filogenética, determinada por MLST. A comparação dos perfis de MLST com a presença de fímbrias, determinada neste estudo, também não mostrou relação entre a detecção destas estruturas e a filogenia.

Cepas altamente patogênicas de *P. gingivalis* em estudos em animais, tais como W83 e W50, pertencem ao genótipo *fimA* IV, mas não expressam fímbrias,

pelo menos sob as condições *in vitro* estudadas (YOSHIMURA et al., 2009). Outros estudos também relataram que W83 é fortemente associada com periodontite (GRIFFEN et al., 1999), e em estudo anterior pudemos demonstrar que *fimA* IV foi associado com a maior profundidade de bolsa periodontal (TEIXEIRA et al., 2009). No presente estudo, quatro de cinco cepas com genótipo IV, incluindo a cepa de referência W83, apresentaram cápsula, e um estudo com grande número de amostras deste genótipo é necessário para avaliar se esta é uma característica comum ao genótipo *fimA IV*. Os nossos dados mostraram que as cepas *fimA* IV estão localizadas em grupos filogenéticos distintos, sugerindo que outros fatores podem variar dentro deste genótipo. Ressalta-se que três amostras do genótipo IV (251C2, 268A2 e HG) apresentavam-se fimbriadas na análise de MET, indicando que este genótipo é mesmo heterogêneo.

A expressão de FimA é regulada por um sistema de dois componentes *fimS / fimR*, e diferenças em *fimS* poderiam resultar na ausência de expressão de fímbrias na cepa W83 (NISHIKAWA; DUNCAN, 2010).

Os dados do presente estudo mostraram que a maioria das cepas estudadas apresenta a região a montante de *fimS* semelhante à W83 (*fimS* W83-*like)*, enquanto apenas três amostras foram semelhantes à cepa fimbriada 33277. Esta região na cepa W83 tem um conteúdo G + C diferente do cromossomo de *P. gingivalis* e provavelmente foi originada por transferência horizontal. Os nossos resultados sugerem que esta inserção foi amplamente difundida na espécie, tendo ocorrido antes da diferenciação dos STs (*sequence typing)*. Esta observação é ainda reforçada pela observação de que três das quatro cepas com região promotora de *fimS* semelhante a 33277 possuem o mesmo ST, apesar destas diferirem em outras características como expressão de fímbria, cápsula e genótipo *fimA* (Figura 10).

A análise da região amplificada a montante de *fimS* mostrou que as sequências em amostras consideradas *W83-like* ou *33277-like* (com base na amplificação por iniciadores complementares a *fimS* de cada uma das amostras de referência) eram bastante conservadas, e em ambos grupos podiam ser encontradas amostras fimbriadas e não fimbriadas, indicando que não seria esta variação em *fimS* a responsável pela ausência da expressão da fímbria em amostras afimbriadas (Figuras 13 e 14).

Estudo prévio (NISHIKAWA et al., 2004) demonstrou que FimR fosforilado não se liga diretamente ao promotor do operon *fimA*, mas à região promotora do primeiro gene (*pg2130*) do cluster *fimA*. Assim, resolvemos analisar se haveriam alterações nessa região que poderiam dificultar a ligação de FimR.

Por outro lado, nas amostras estudadas, a região a montante de *pg2130*, onde FimR se liga, foi idêntica a de 33277. Uma delas tinha a região promotora de *fimS* semelhante a 33277 (beta) e a outra semelhante a W83 (279C1). Os dados sugerem então, que as alterações em sequências detectadas em *fimR*, na região promotora de *fimS* e no sitio de ligação de FimR em *pg2130* não são responsáveis pela ausência da expressão de FimA, visto que foram detectadas em amostras expressando a subunidade fimbrial. Por outro lado, a ausência de detecção de fímbria por MET com concomitante detecção de FimA por Western blot na cepa beta (Tabela 6) deve ser interpretada com cautela, pois as condições empregadas para esta análise foram as mesmas para ambos ensaios (Western Blot e MET - desenvolvimento em meio sólido), mas a manipulação para o MET pode ter destruído a fímbria, ou esta cepa poderia ter deficiência no transporte/montagem da fímbria.

A seguir, foi realizada a análise da região codificadora do domínio quinase de *fimS*, com base no estudo de Nishikawa et al., 2010, que indicou que W83 não expressa a fímbria devido a alteração nesta região (Figura 18). No entanto a inserção observada em W83 mostrou ser este um evento exclusivo desta cepa, e não foi observada nas demais amostras não fimbriadas, sugerindo que outros fatores seriam responsáveis pela ausência de expressão da fímbria nas demais amostras não fimbriadas (Figura 19).

Visamos então testar a hipótese de que os níveis de transcrição de *fimA* poderiam ser influenciados pelos níveis de transcrição dos genes codificando o sistema regulador de resposta *fimS* / *fimR*. Para isso, foi determinado o nível de transcrição relativa dos três genes, *fimS*, *fimR* e *fimA*, na condição *in vitro.* Pudemos demonstrar que cepas classificadas como *fimS* W83-*like* mostraram um baixo nível de transcrição de *fimA* quando comparadas com a 33277, exceto para as cepas 251C2 (*fimA* IV) e 279C1 (*fimA* V) (Tabela 4). A maioria das cepas apresentou a região promotora de *fimS* semelhante a W83, e estas apresentaram uma baixa transcrição não só de *fimA* mas também *fimS* e *fimR*, enquanto que aquelas que apresentaram a região promotora de *fimS* semelhante a 33277 são

filogeneticamente relacionadas e apresentaram níveis elevados de transcrição de *fimA*, com uma exceção (cepa 268A2) que pertence a um grupo filogenético distinto das demais *fimS* 33277-*like* (Tabelas 4 e 5 e Figura 10).

Um estudo recente (ZHENG; WU; XIE, 2011) mostrou associação entre a expressão de *fimA* e o genótipo *fimA*. O genótipo *fimA* I apresentou o maior nível de transcrição seguido pelos tipos II, III e IV. Estes dados estão de acordo com nossos dados. No nosso estudo, o nível mais elevado de transcrição *fimA* foi observado na cepa *fimA* V, genótipo que não foi avaliado pelo estudo mencionado. *fimA* I / Ib tendem a se agrupar na análise filogenética, e este *cluster*, onde 33277 também é encontrada, pode ter algumas características comuns, como região promotora de *fimS* similar, o que pode explicar o aumento da transcrição de *fimA*. Por outro lado, embora todas as amostras do tipo II tenham apresentado fímbrias por MET, estas apresentaram grande variação nos níveis de transcrição de *fimA* [1381A com transcrição relativa de *fimA* no controle de 0,04; contra valores entre 0,69-0,83 (em relação aos valor de 1 em 33277) nas demais amostras do tipo II] (Tabela 4).

Apesar da maioria das amostras ser fimbriada, segundo os dados obtidos por MET, a transcrição de *fimA* comparável a 33277 foi raramente encontrada entre as cepas clínicas após desenvolvimento *in vitro*, sugerindo ausência ou níveis baixos de expressão de FimA dentro da população de *P. gingivalis*. Esta observação é também corroborada por outros dados deste estudo, que mostraram que não só *fimA*, mas também *fimS* e *fimR* não são transcritos pela maioria das cepas na mesma magnitude observada para a cepa fimbriada 33277.

Curiosamente, a cápsula foi detectada em várias cepas, incluindo algumas que têm a região promotora de *fim*S semelhante a 33277, e produção de fímbrias e cápsula pela mesma amostra, diferindo da cepa W83. Esta observação de transcrição de *fim*A, e detecção de fímbrias por MET simultaneamente à detecção de cápsula por microscopia óptica em 9 das amostras testadas (Tabela 2), é indicativa de que ambas estruturas poderiam contribuir para a virulência das mesmas cepas, e é um dado inédito na literatura.

O gene *fimR* foi detectado em todas as cepas. No entanto, a análise de sequências da região *fimS-fimR* de seis amostras possibilitou a detecção de alterações no gene *fimR* em duas amostras: 279C1 e beta (Figura 13), sendo que a fímbria foi detectada por MET apenas na amostra 279C1, embora ambas tenham apresentado a proteína FimA por Western Blot. Deve ser salientado que

estas alterações não estiveram presentes em domínios conservados de FimR, sugerindo que a proteína seria funcional, mas encontravam-se no sítio de ligação do DNA. Nestas amostras, os níveis de transcritos *fimA* foram semelhantes ou superiores aos da 33277, após a cultura *in vitro*, como mostrado nas Tabelas 4 e 5, e foram bastante eficientes na adesão a células epiteliais, embora a transcrição relativa de *fimS* e *fimR* tenha sido menor em beta do que em 33277 ou 279C1.

Seria possível que alterações ambientais em W83 e outras amostras não fimbriadas, não expressando *fimA* após desenvolvimento *in vitro,* levassem a indução da expressão da fímbria. Consideramos que a sua expressão poderia ocorrer em ambiente onde a fímbria se faça necessária, como num ambiente com fluxo, onde a bactéria tenha necessidade de mecanismos de adesão, na presença do substrato para a adesão, como a célula epitelial, ou em outras condições encontradas na cavidade oral como diferentes pHs e osmolaridade. Assim, a regulação destes genes foi analisada sob diferentes condições ambientais, nas amostras de referência, e após contato com célula epitelial, em todas as cepas utilizadas neste estudo.

Para tentar explicar diferenças nos níveis de expressão de *fimA* entre as amostras, foi determinada não somente a transcrição relativa de *fimA*, mas também a transcrição dos genes codificando o sistema de regulação *fimSR*. Inicialmente optamos por analisar se alguma condição ambiental favoreceria a expressão de *fimA* na cepa W83. Estudos prévios mostraram que a expressão e produção de FimA é requerida para a colonização de *P. gingivalis* (NISHIYAMA et al., 2007). Assim, foi formulada a hipótese de que a cepa W83 poderia produzir a fímbria, sob determinadas condições, diferindo daquelas comumente observadas *in vitro.* A expressão gênica poderia ser afetada por alterações ambientais como pH, temperatura e meio de cultivo, e estas condições foram testadas em 33277 e W83. No entanto, apesar de haverem diferenças na transcrição de *fimA* em W83 (Figura 21), os níveis relativos de transcritos foram muito mais baixos que os de 33277, cerca de 100 vezes menor, na condição controle.

Fatores como pH baixo e alta temperatura regularam negativamente a transcrição de *fimA* em 33277. O baixo pH pode ser encontrado em biofilme supragengival submetido a alta freqüência de carboidratos e difícil acesso do tampão salivar, condição que favorece organismos cariogênicos e desfavorece patógenos periodontais como *P. gingivalis.* Outra condição de baixo pH ocorre nos

tecidos gengivais inflamados, devido a liberação do conteúdo lisossomal de fagócitos. A inflamação resulta também em aumento da temperatura (42 ^{o}C), que pode ser observada em bolsas periodontais profundas (HAFFAJEE; SOCRANSKY; GOODSON 1992). Assim, a regulação negativa da transcrição de *fimA* em alta temperatura e baixo pH poderia refletir uma estratégia de *P. gingivalis* para favorecer sua sobrevivência em sítios de inflamação. A fímbria de *P. gingivalis* induz a produção de anticorpos e ativação das células T (LIN et al., 2003). Assim, os dados aqui apresentados, sugerem que na exacerbação do quadro inflamatório, e consequentemente dos mecanismos de defesa do hospedeiro, *P. gingivalis* reprime a expressão de *fimA* como um escape da resposta imune do hospedeiro favorecendo, assim, a sua persistência nos tecidos inflamados.

Na mesma linha de raciocínio, analisamos a transcrição de *fimA* e dos genes do regulador de resposta *fimSR* após interação com a célula epitelial.

A cepa 279C1, classificada como genótipo *fimA* V, apresentou níveis muito elevados de transcrição de *fimA*, tanto *in vitro* como após interação com a célula. Os níveis de transcrições de *fimS* e *fimR* desta cepa foram também os mais elevados entre as cepas estudadas, que poderia ajudar a explicar a alta de transcrição de *fimA*. Entretanto a cepa HNA, também classificada como genótipo *fimA* V, apresentou níveis muito baixos de transcrição de *fimA*, *fimS* e *fimR*, mostrando que estes altos níveis de transcritos não caracterizam o genótipo *fimA V*.

Não houve relação entre o genótipo *fimA* e a capacidade de adesão a células epiteliais gengivais. Além disso, não houve diferença na média da eficiência de adesão entre cepas fimbriadas e não fimbriadas, sugerindo que, outras estruturas além das fímbrias poderiam desempenhar um papel na interação com as células epiteliais.

O maior valor de eficiência de adesão foi observado com a amostra HW24D-1 que é classificada como *fimA* II. Estudo prévio mostrou que a fimbrilina FimA II promoveu maior adesão a células epiteliais quando comparada a FimA I (KATO et al., 2007). Assim, quando se avalia a eficiência de adesão a célula epitelial, não apenas a presença de fímbrias, níveis de transcrição e da proteína FimA, mas também o genótipo *fimA* deve ser considerado. Outros fatores devem interferir na estabilidade das fímbrias, particularmente devido a fragilidade das fímbrias extremamente longas das amostras do genótipo *fimA* I.

A interação com células epitelias levou a regulação positiva de *fimA* em 6 amostras fimbriadas e 5 não fimbriadas (Tabelas 4 e 5). E esta regulaçao positiva de *fimA* não foi necessariamente acompanhada por regulação positiva dos genes associados aos reguladores de resposta, como observado nas amostras 33277 e HWI. Assim, os dados indicam que a regulação de *fimS* e *fimR* ocorre de maneira independente da regulação do cluster *fimA*.

A observação da presença de fímbrias longas por MET é indicativa de expressão de *fimA*, mas nos isolados clínicos este dado deveria ser confirmado pela determinação da presença de FimA nas células. Com este objetivo, obtivemos soro reativo contra os peptídeos de FimA, e optamos, a princípio, por realizar ensaios de ELISA para análise quantitativa de FimA, visto que nessa técnica podem ser obtidos valores de ng / proteína por poço, ao compararmos os valores de absorbância com a curva padrão. Porém ao realizarmos um ensaio piloto desse experimento verificamos uma alta quantidade de reações cruzadas (dados não demonstrados). Esse mesmo problema foi reportado no estudo de Nagano et al., 2012, no qual também foram utilizados sonicados de células totais como antígenos e os soros obtidos reagiram a outros componentes bacterianos. Destacamos que mesmo o soro não imune levou a reação, sendo possivelmente devido à resposta a algum organismo da microbiota dos animais.

Sendo assim optamos pela realização de ensaios de Western Blot. Apesar dessa técnica não permitir uma quantificação precisa, particularmente pelo uso de dois soros distintos, com títulos diferentes, e pelos vários genótipos *fimA*, foi possível detectar a expressão da fímbria através da presença de monômeros de aproximadamente 40KDa, correspondente ao monômero da fímbria. Várias outras bandas foram também marcadas com o uso dos soros contra os peptídeos FimA, confirmando a impossibilidade de usar ELISA (Figuras 24 e 25).

No estudo de Nagano et al. 2012, a reatividade cruzada, para o ensaio de Western-blot, entre soros contra FimA de diferentes genótipos foi consideravelmente baixa e possivelmente devido ao reconhecimento preferencial de uma conformação ou um epítopo descontínuo de polímeros FimA. No presente estudo optamos por usar como antígeno peptídeos de uma região mais conservada entre os genótipos, e a reatividade cruzada foi maior. Por outro lado, em nosso estudo, a estratégia de desenhar o peptídeo em regiões conservadas de FimA permitiu a reatividade com amostras não tipáveis ou do tipo V. FimA foi detectado em todas as amostras

fimbriadas por MET, confirmando que a fímbria detectada foi a fímbria principal. Da mesma maneira, FimA não foi detectado na amostra W83 e nas amostras não fimbriadas. Em apenas 2 amostras (HNA e beta), o resultado de Western Blot não confirmou a análise por MET, ambas foram MET negativa e Western +, este resultado poderia ser devido a destruição da fímbria longa, muito frágil, particularmente do genótipo I (beta), decorrente da manipulação da amostra.

Assim, os dados do presente estudo permitem concluir que as fímbrias e a cápsula estão amplamente distribuídas em *P. gingivalis*, e que eventos específicos a cada isolado na região que codifica os reguladores de resposta FimSR ou mesmo no primeiro gene do cluster *fimA* regulado por estes, poderiam ter causado a ausência da expressão de fímbrias. A inserção a montante de *fimS* encontrada em W83 é comum a maioria dos isolados, embora muitos destes expressem a fímbria. O contato com células epiteliais regula positivamente a expressâo de *fimA* na maioria das amostras da espécie, mas não em todas. A regulação da expressão dos genes que codificam o regulador de resposta FimSR não se relaciona a regulação de *fimA*. Os dados indicam que a regulação de *fimA* em *P. gingivalis* é cepa específica, portanto os mecanismos relatados para cepas de referência não podem ser reconhecidos para atribuir um comportamento comum a espécie.

6 CONCLUSÕES

Não houve correlação entre os genótipos *fimA* ou a presença de fímbrias e/ou cápsula e perfis de macrorestrição determinados por PFGE.

A maior parte das cepas possui a região promotora de *fimSR* semelhante à cepa W83.

fimA foi regulado positivamente após interação com células epiteliais na maioria das cepas fimbriadas e não-fimbriadas.

Todas as cepas foram capazes de aderir às células eucarióticas, não havendo alteração entre fimbriadas e não fimbriadas.

Foi detectada a proteína FimA por Western Blot nas cepas classificadas como fimbriadas pela análise por MET.

Os dados obtidos indicam que a regulação da transcrição de *fimA* é cepa específica, e outros componentes além da fímbrias principais podem estar envolvidos na interação com as células epiteliais.

REFERÊNCIAS*

AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5721-5732, 2005.

ADUSE-OPOKU, J.; SLANEY, J. M.; HASHIM, A.; GALLAGHE, A.; RANGARAJAN, M.; BOUTAGA, K.; LAINE, M. L.; VAN WINKELHOFF, A. J.; CURTIS, M. A. Identification and Characterization of the Capsular Polysaccharide (K-Antigen) Locus of *Porphyromonas gingivalis.* **Infection Immunity.**., v. 74, p. 449-460, 2006.

AMANO, A. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. **Front. Biosci,** v. 12, p. 3965-3974, 2007.

AMANO, A.; KUBONIWA, M.; NAKAGAWA, I.; AKIYAMA, S.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fim*A and periodontal health status. **J. Dent. Res.**., v. 79, p. 1664-1668, 2000.

AMANO, A; NAKAGAWA, I.; KATAOKA, K.; MORISAKI I.; HAMADA, S. Distribution of *Porphyromonass gingivalis* strains 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. Periodont. Res.**, v. 39, p. 136-142, 2004.

AMANO, A.; SHARMA, A.; SOJAR, H. T.; KURAMITSU, H. K.; GENCO, R. J. Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis.* **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4682-4685, 1994.

ASANO, H.; ISHIHARA, K.; NAKAGAWA, T.; YAMADA, S.; OKUDA, K. Relationship between transmission of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* type in spouses. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 1355-1360, 2003.

BAGAITKAR, J.; DEMUTH, D. R.; DAEP, C. A.; RENAUD, D. E.; PIERCE, D. L.; SCOTT, D. A. Tobacco upregulates *P. gingivalis* fimbrial proteins which induce TLR2 hyposensitivity. **PLoS One**, v. 5, p. 1-11, 2010.

BOISVERT, H.; DUNCAN, M. J. Clathrin-dependent entry of a gingipain adhesin peptide and *Porphyromonas gingivalis* into host cells. **Cell Microbiol.** , v. 10, p. 2538-2552, 2008.

BOISVERT, H.; DUNCAN, M. J. Translocation of *Porphyromonas gingivalis* gingipain adhesin peptide A44 to host mitochondria prevents apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 3616-3624, 2010.

BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G. N. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 333, p. 1-9, 2012.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS**. NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

CHANG, C.; STEWART, R. C. The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 723-731, 1998.

COSTEA, D. E.; DIMBA, A. O.; LORO, L. L.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNESSEN, A. C. The phenotype of in vitro reconstituted normal human oral epithelium is essentially determined by culture medium. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, p. 247-252, 2005.

DARVEAU, R. P.; HAJISHENGALLIS, G.; CURTIS, M. A. *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. **J. Dent. Res.** , v. 91, p. 816-820, 2012.

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

D´EPIRO, T. T. S. **Estrutura populacional, características fenotípicas e variabilidade do lócus de síntese do polissacarídeo capsular de amostras de *Porphyromonas gingivalis*.** 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

DOETSH, R. N. Determinative methods of light microscopy. In: GERHARDT, P. (Ed.). **Manual of methods for general bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1981. v. 29.

DUNCAN, M. J.; NAKAO, Z.; XIE, H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 2260-2265, 1993.

EICK, S.; RODEL, J.; EINAX, J. W.; PFISTER, W. Interation of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 17, p. 201-208, 2002.

ENERSEN, M.; OLSEN, I.; KVALHEIM, O.; CAUGANT, D. A. fimA Genotypes and Multilocus Sequence Types of *Porphyromonas gingivalis* from Patients with Periodontitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 31–42, 2008.

GRENIER, D.; GOULET, V.; MAYRAND, D. The capacity of *Porphyromonas gingivalis* to multiply under iron-limiting conditions correlates with its pathogenicity in an animal model. **J. Dent. Res.**, v. 80, p. 1678-1682, 2001.

GRENIER, D.; MAYRAND, D. Selected characteristics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis* .**J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 738-740, 1987.

GRIFFEN, A. L.; LYONS, S. R.; BECKER, M. R.; MOESCHBERGER, M. L.; LEYS, E. J. *Porphyromonas gingivalis* strain variability and periodontitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 4028-4033, 1999.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbiology of periodontal diseases: introduction. **Periodontol. 2000**, v. 38, p. 9-12, 2005.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; GOODSON, J. M. Subgingival temperature (I). Relation to baseline clinical parameters. **J. Clin. Periodontol.**, v. 19, p. 401-408, 1992.

HAMADA, N.; SOJAR, H. T.; CHO, M. I.; GENCO, R. J. Isolation and characterization of a minor fimbria from *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 4788-4794, 1996.

HANDFIELD, M.; MANS, J. J.; ZHENG, G.; LOPEZ, M. C.; MAO, S.; PROGULSKE-FOX, A.; NARASIMHAN, G.; BAKER, H. V.; LAMONT, R. J. Distinct transcriptional profiles characterize oral epithelium-microbiota interactions. **Cell Microbiol.**, v. 7, p. 811-823, 2005.

HAROKOPAKIS, E.; ALBZREH, M. H.; MARTIN, M. H.; HAJISHENGALLIS, G. TLR2 transmodulates monocyte adhesion and transmigration via Rac1- and PI3K-mediated inside-out signaling in response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. **J. Immunol.**, v. 176, p. 7645-7656, 2006.

HASHIMOTO, M.; OGAWA, S.; ASAI, Y.; TAKAI, Y.; OGAWA, T. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to *Treponema denticola* dentilisin. **FEMS Microbiol. Lett.** , v. 226, p. 267-271, 2003.

HAYASHI, J.; NISHIKAWA, K.; HIRANO, R.; NOGUCHI, T.; YOSHIMURA, F. Identification of a two-component signal transduction system involved in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiol. Immunol.**, v. 44, p. 279-282, 2000.

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

HIROI, M.; SHIMOJIMA, T.; KASHIMATA, M.; MIYATA, T.; TAKANO, H.; TAKAHAMA, M.; SAKAGAMI, H. Inhibition by *Porphyromonas gingivalis* LPS of apoptosis induction in human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. **Anticancer Res.**, v. 5A, p. 3475-3479, 1998.

HOLT, S.; EBERSOLE, J. *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex,” a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontol. 2000**, v. 38, p. 72–122, 2005.

INABA, H.; NAKANO, K.; KATO, T. A. Heterogenic virulence and related factors among clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 29-35, 2008.

JOTWANI, R.; CUTLER, C. W. Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory Th1 effector response. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1725-1732, 2004.

KATO, T.; KAWAI, S.; NAKANO, K.; INABA, H.; KUBONIWA, M.; NAKAGAWA, I.; TSUDA, K.; OMORI, H.; OOSHIMA, T.; YOSHIMORI, T.; AMANO, A. Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. **Cell Microbiol.**, v. 9, n. 3, p. 753-765, 2007

KUBONIWA, M.; AMANO, A.; INABA, H.; HASHINO, E.; SHIZUKUISHI, S. Homotypic biofilm structure of *Porphyromonas gingivalis* is affected by FimA type variations. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 3, p. 260-263, 2009.

KUBONIWA, M.; AMANO, A.; SHIZUKUISHI,S.; NAKAGAWA, I.; HAMADA, S. Specific antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Lys-Gingipain by DNA vaccination inhibit bacterial binding to hemoglobin and protect mice from infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 2972-2979, 2001.

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.

LAMONT, R. J.; CHAN, A.; BELTON, C. M.; IZUTSU, K. T.; VASEL, D.; WEINBERG, A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3878-3885, 1995.

LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 6, p. 341-349, 2000.

LEE, J. Y.; SOJAR, H. T.; BEDI, G. S.; GENCO, R. J. *Porphyromonas gingivalis* fimbrilin: size, amiino terminal sequence, and antigenic heterogeneith. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 383-389, 1991

LIN, D.; SMITH, M. A.; ELTER, J.; CHAMPAGNE, C.; DOWNEY, C. L.; BECK, J.; OFFENBACHER, S. *Porphyromonas gingivalis* infection in pregnant mice is associated with placental dissemination, an increase in the placental Th1/Th2 cytokine ratio, and fetal growth restriction. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 5163-5168, 2003.

LO BUE, A. M.; ROSSETTI, B.; CALÌ, G.; NICOLETTI, G.; CONDORELLI, F. Antimicrobial interference of a subinhibitory concentration of azithromycin on fimbrial production of *Porphyromonas gingivalis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 40, p. 653-657, 1997.

MAEDA, K.; NAGATA, H.; KUBONIWA, M.; KATAOKA, K.; NISHIDA, N.; TANAKA, M.; SHIZUKUISHI, S. Characterization of binding of Streptococcus oralis glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5475-5477, 2004.

MALEK, R.; FISHER, J. G.; CALECA, A.; STINSON, M.; VAN OSS, C. J.; LEE, J. Y.; CHO, M. I.; GENCO, R. J.; EVANS, R. T.; DYER, D. W. Inactivation of the *Porphyromonas gingivalis fimA* gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 1052-1059, 1994.

MAO, S.; PARK, Y.; HASEGAWA, Y.; TRIBBLE, G. D.; JAMES, C. E.; HANDFIELD, M.; STAVROPOULOS, M. F.; YILMAZ, O.; LAMONT, R. J. Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by *Porphyromonas gingivalis*. **Cell Microbiol.**, v. 9, p. 1997-2007, 2007.
MASUDA, T.; MURAKAMI, Y.; NOGUCHI, T.; YOSHIMURA, F. Effects of various growth conditions in a chemostat on expression of virulence factors in *Porphyromonas gingivalis*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, p. 3458-3467, 2006.

MEALEY, B. L.; ROSE, L. F. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v. 29, p. 402-408, 2008.

MIKULS, T. R.; THIELE, G. M.; DEANE, K. D.; PAYNE, J. B.; O'DELL, J. R.; YU, F.; SAYLES, H.; WEISMAN, M. H.; GREGERSEN, P. K.; BUCKNER, J. H.; KEATING, R. M.; DERBER, L. A.; ROBINSON, W. H.; HOLERS, V. M.; NORRIS, J. M. *Porphyromonas gingivalis* and disease-related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 64, p. 3522-3530, 2012.

MISSAILIDIS, C. G.; UMEDA, J. E.; OTA-TSUZUKI, C.; ANZAI, D.; MAYER, M. P. A. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with different periodontal conditions. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 224-229, 2004.

NAGANO, K.; HASEGAWA, Y.; MURAKAMI, Y.; NISHIYAMA, S.; YOSHIMURA, F. FimB regulates FimA fimbriation in *Porphyromonas gingivalis*. **J. Dent. Res.**, v. 89, p. 903-908, 2010.

NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; KUBONIWA, M.; NAKAMURA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Functional differences among FimA variants of *Pophyromonas gingivalis* and their effects on adhesion and invasion of human epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 277-285, 2002.

NELSON, K. E.; FLEISCHMANN, R. D.; DEBOY, R. T. Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 5591–5601, 2003.

NISHIKAWA, K.; DUNCAN, M. J. Histidine kinase-mediated production and autoassembly of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. **J. Bacteriol.**, v. 192, p. 1975-1987, 2010.

NISHIKAWA, K.; YOSHIMURA, F.; DUNCAN, M. J. A regulation cascade controls expression of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae via the FimR response regulator. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 546-560, 2004.

NISHIYAMA, S.; MURAKAMI, Y.; NAGATA, H.; SHIZUKUISHI, S.; KAWAGISHI, I.; YOSHIMURA, F. Involvement of minor components associated with the FimA fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* in adhesive functions. **Microbiology**, v. 153, p. 1916-1925, 2007.

OFFENBACHER, S.; BOGGESS, K. A.; MURTHA, A. P.; JARED, H. L.; LIEFF, S.; MCKAIG, R.G.; MAURIELLO, S. M.; MOSS, K.L.; BECK, J.D. Progressive

periodontal disease and risk of very preterm delivery. **Obstet. Gynecol.**, v. 107, p. 29-36, 2006.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

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

PASTER, B. J.; OLSEN, I.; AAS, J. A.; DEWHIRST, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontol. 2000**, v. 42, p. 80-87 2006.

RICHARDSON, J.; CRAIGHEAD, J. C.; CAO, S. L.; HANDFIELD, M. Concurrence between the gene expression pattern of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized aggressive periodontitis and in human epithelial cells. **J. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 497-504, 2005.

ROTH, G. A.; ANKERSMIT, H. J.; BROWN, V. B.; PAPAPANOU, P. N.; SCHMIDT, A. M.; LALLA, E. *Porphyromonas gingivalis* infection and cell death in human aortic endothelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 272, p. 106-113, 2007.

SHARMA, A.; HONMA, K.; EVANS, R. T.; HRUBY, D. E.; GENCO, R. J. Oral immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing *Porphyromonas gingivalis* FimA domains. **Infect. Immun.** , v. 69, p. 2928-2934, 2001.

SLOTS, J. Uptade on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. **J. Int. Acad. Periodontol.**, v. 1, p. 121-126, 1999.

SMALLEY, J. W.; BIRSS, A. J.; SZMIGIELSKI, B.; POTEMPA, J. The HA2 haemagglutinin domain of the lysine-specific gingipain (Kgp) of *Porphyromonas gingivalis* promotes micro-oxo bishaem formation from monomeric iron(III) protoporphyrin IX. **Microbiology**, v. 152, p. 1839-1845, 2006.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol. 2000**, v. 38, p. 135-187, 2005.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; DZINK, J. L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, p. 134-144, 1998.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; SMITH, C.; DUFF, G. W. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, p. 810-818, 2000.

SOJAR, H. T.; SHARMA, A.; GENCO, R. J. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae bind to cytokeratin of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 96-101, 2002.

STATHOPOULOU, P. G.; GALICIA, J. C.; BENAKANAKERE, M. R.; GARCIA, C .A..; POTEMPA, J.; KINANE, D. F. *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. **BMC Microbiol.,** v. 9, p. 1-12, 2009.

SUZUKI, Y.; YOSHIMURA, F.; TAKAHASHI, K.; TANI, H.; SUZUKI T. Detection of fimbriae and fimbrial antigens on the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis* by negative staining and serological methods. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 2713-2720, 1988.

TEIXEIRA, S. R. L.; MATARAZZO, F.; FERES, M.; FIGUEIREDO, L. C.; FAVERI, M.; SIMIONATO, M. R. L.; MAYER M. P. A. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, p. 482-487, 2009.

TSUDA, K.; FURUTA, N.; INABA, H.; KAWAI, S.; HANADA, K.; YOSHIMORI, T.; AMANO, A. Functional analysis of alpha5beta1 integrin and lipid rafts in invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicles. **Cell Struct. Funct.**, v. 33, p. 123-132, 2008.

UMEDA, J. E.; MISSAILIDIS, C.; LONGO, P. L.; ANZAI, D.; WIKSTROM, M.; MAYER, M. P. A. Adhesion and invasion to epithelial cells by *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis***. Oral Microbiol. Immunol.**, v. 21, p. 415-419, 2006.

WANG, M.; SHAKHATREH, M. A.; JAMES, D.; LIANG, S.; NISHIYAMA, S.; YOSHIMURA, F.; DEMUTH, D. R.; HAJISHENGALLIS, G. Fimbrial proteins of *Porphyromonas gingivalis* mediate in vivo virulence and exploit TLR2 and complement receptor 3 to persist in macrophages. **J. Immunol.** , v. 179, p. 2349-2358, 2007.

WANG, Q.; ZHOU, X. D.; ZHENG, Q. H.; WANG, Y.; TANG, L.; HUANG, D. M. Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in chronic apical periodontitis associated with symptoms. **J. Endod.** , v. 36, p. 1790-1795, 2010.

WEINBERG, A.; BELTON, C. M.; PARK, Y.; LAMONT, R. J. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 313-316, 1997.

XIE, H.; CAI, S.; LAMONT, R.J. Environmental regulation of fimbrial gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun**., v. 65, p. 2265-2271,1997.

XIE, H.; KOZLOVA, N.; LAMONT, R.J. *Porphyromonas gingivalis* genes involved in fimA regulation. **Infect. Immun**., v. 72, p. 651-65, 2004.

YANG, H. W.; HUANG, Y. F.; CHOU, M. Y. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects." **J. Periodontol.**, v. 75, p. 1077-1083, 2004.

YILMAZ, O.; JUNGAS, T.; VERBEKE, P.; OJCIUS, D. M. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, v. 7, p. 3743-3751, 2004.

YILMAZ, O; WATANABE, K.; LAMONT, R. J. Invovement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. **Cell Microbiol.,** v. 5, p. 305-314, 2002.

YOSHIMURA, F.; MURAKAMI, Y.; NISHIKAWA, K.; HASEGAWA, Y.; KAWAMINAMI, S. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. **J. Periodont. Res.**, v. 44, p. 1-12, 2009.

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

YOSHIMURA, M., OHARA, N.; KONDO, Y.; SHOJI, M.; OKANO, S.; NAKANO, Y.; ABIKO, Y.; NAKAYAMA, K. Proteome analysis of *Porphyromonas gingivalis* cells placed in a subcutaneous chamber of mice. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 413-418, 2008.

YUAN, L.; RODRIGUES, P. H.; BÉLANGER, M.; DUNN, W. A. JR.; PROGULSKE-FOX, A. *Porphyromonas gingivalis* htrA is involved in cellular invasion and in vivo survival. **Microbiology**, v. 154, p. 1161-1169, 2008.

ZARIC, S.; SHELBURNE, C.; DARVEAU, R.; QUINN, D. J.; WELDON, S.; TAGGART, C. C.; COULTER, W. A. Impaired immune tolerance to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide promotes neutrophil migration and decreased apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 4151-4156, 2010.

ZHENG, C.; WU, J.; XIE, H. Differential expression and adherence of *Porphyromonas gingivalis* FimA genotypes. **Mol. Oral Microbiol.**, v. 26, p. 388-395, 2011.

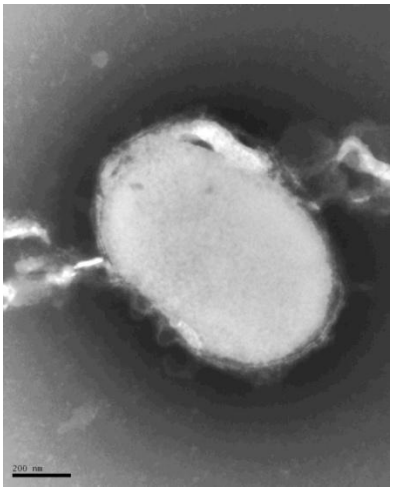
APÊNDICE A - Características das cepas utilizadas no presente estudo

Cepas de *P. gingivalis*	Fonte	Tipo *fimA*	Condição Periodontal
33277	T. Amano, Universidade de Osaka, Japão	I	
HW24D-1		II	
6/26		III	
HG564		IV	
W83		IV	
HNA99		V	
KdII865	M. Wikström, Universidade de Goteborg, Suécia	NT	
KdII289		Ib	
P9/86		II	
251 C2	Umeda et al., 2006 Amostras isoladas em São Paulo de pacientes com diferentes condições periodontais. FAPESP 02/05138-6	IV	Periodontite
259 B1		Ib	Periodontite
324 A4		I	Periodontite
261 A1		Ib	Periodontite
268 A2		IV	Periodontite
279 C1		V	Periodontite
323 B1		II	Periodontite
316 AB		I	Periodontite
1381 A		II	Gengivite
316 AA		Ib	Periodontite
259 C3		V	Periodontite
Alfa	Maria Regina Simionato Universidade de São Paulo Amostras isoladas de pacientes com periodontite	NT	Periodontite
Beta		I	Periodontite
Gama		I	Periodontite

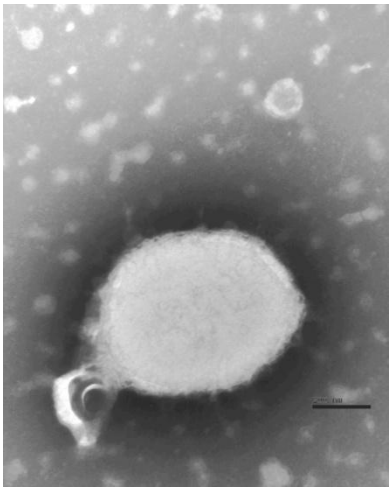
APÊNDICE B - Fotomicrografias da superfície externa das células de *P. gingivalis* através de visualização por MET

Tipo I

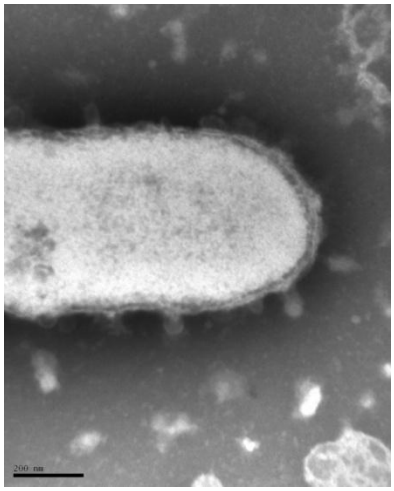
Beta



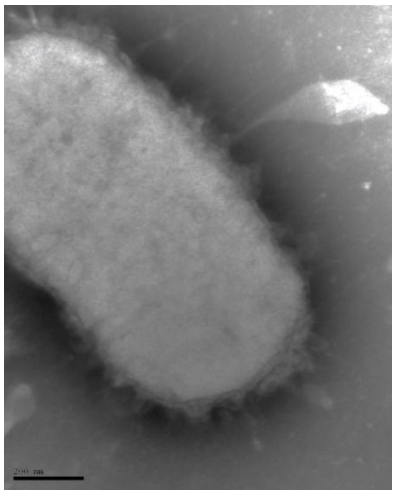
Gama



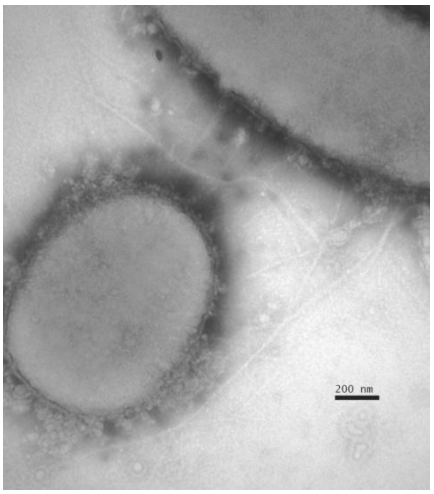
324A4



316AB

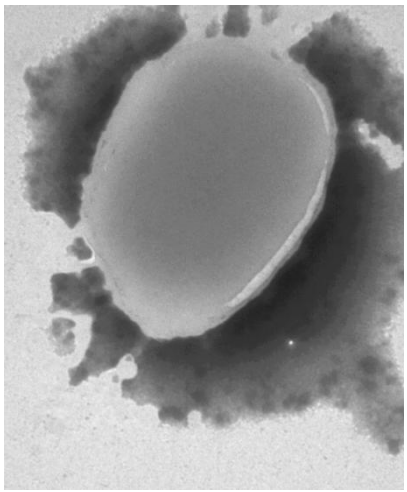


33277

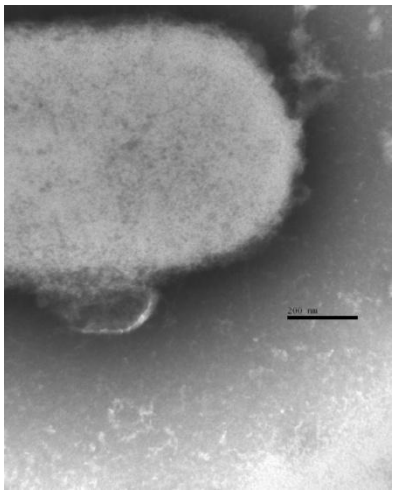


Tipo Ib

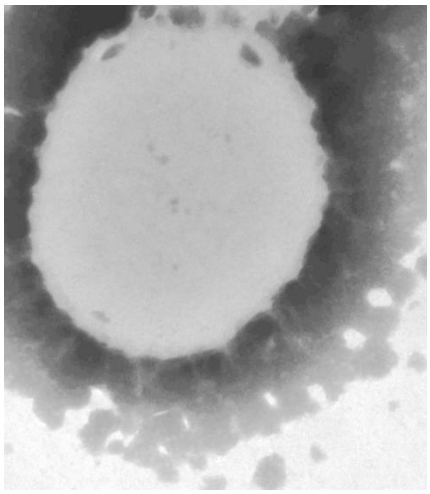
316AA



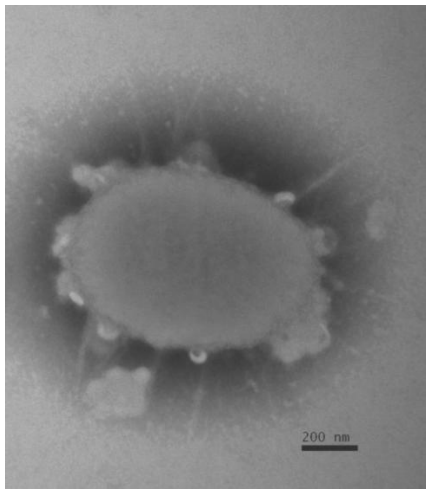
259B1



Kd289

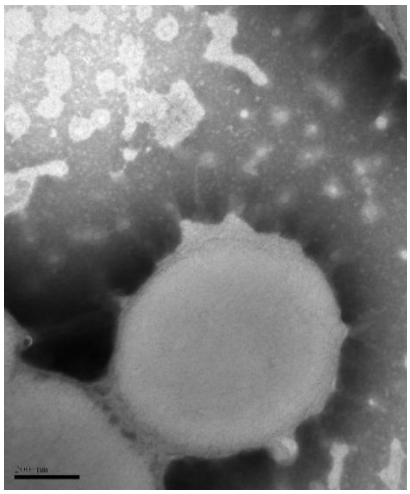


261A

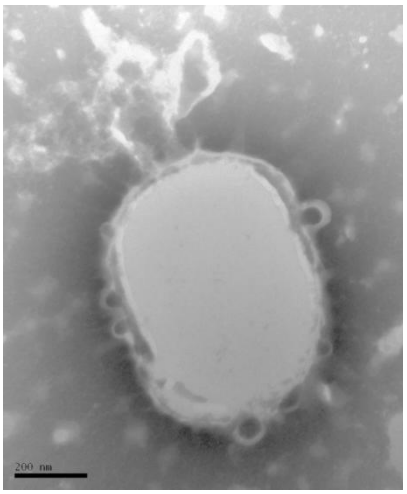


Tipo II

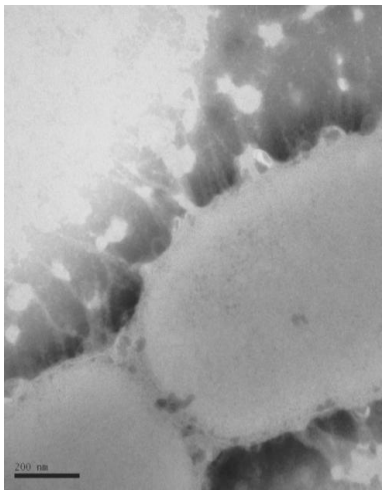
P986



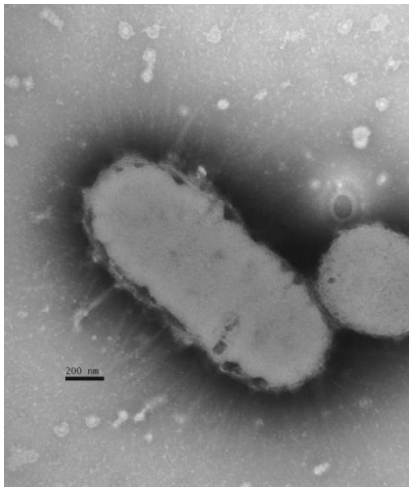
322B1



1381A

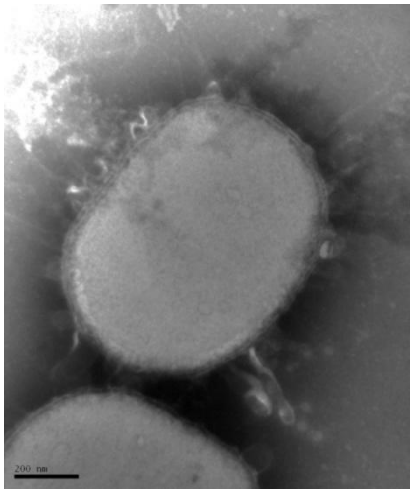


HW



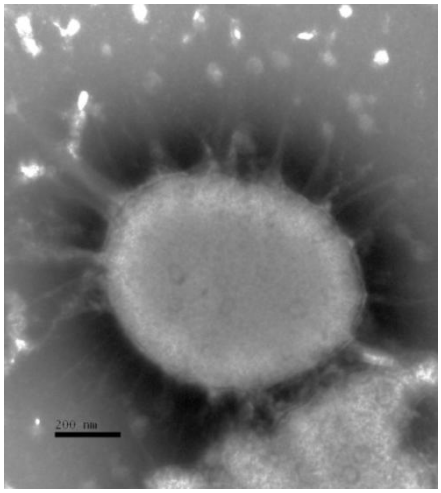
Tipo III

6/26



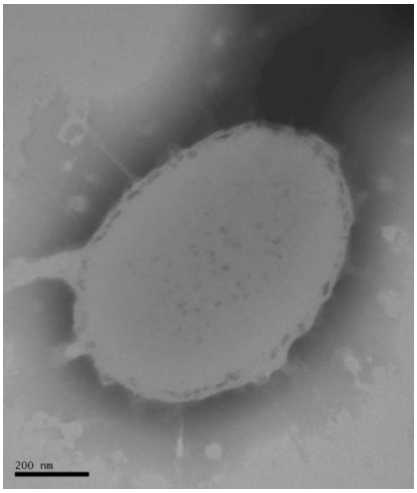
Tipo IV

251C2

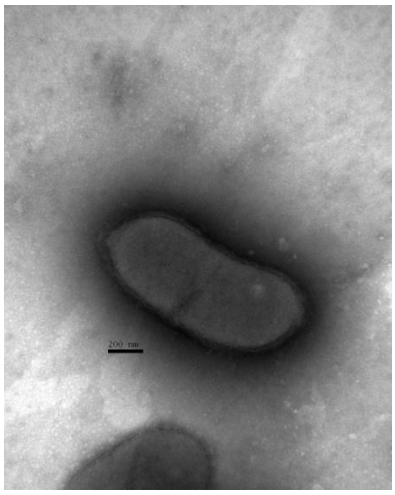


HG

268A2

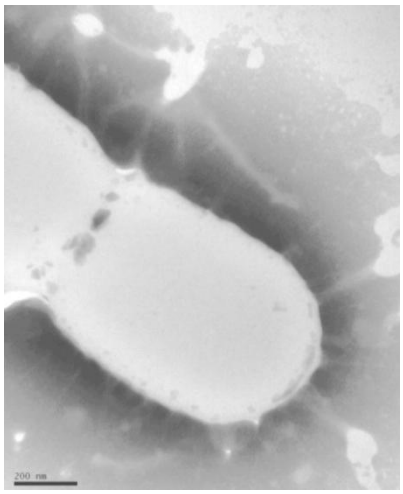


W83

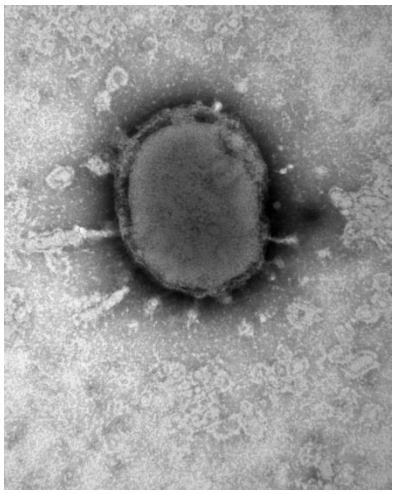


Tipo V

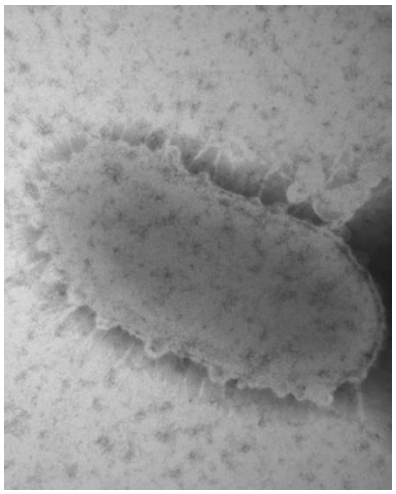
279C1



HNA

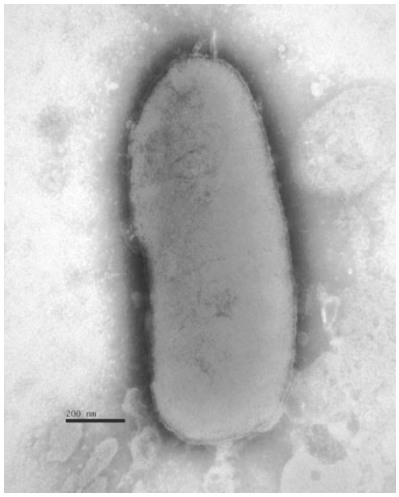
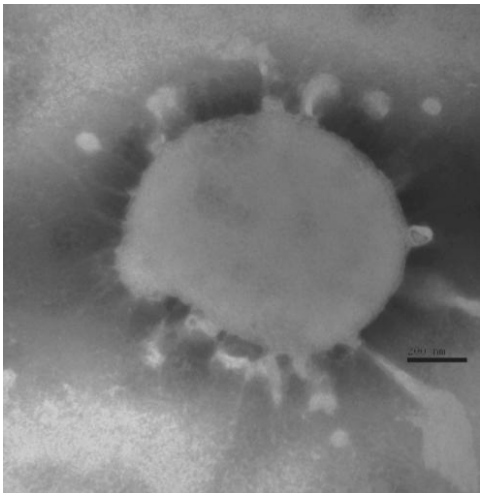


259C3



NT

Alfa



Kd865