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

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.

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).

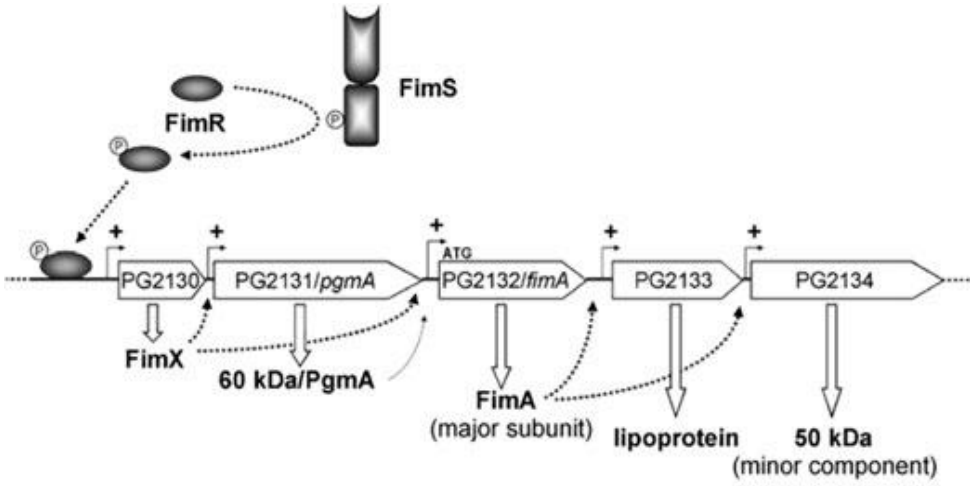
A expressão de fímbrias está associada com a formação de biofilmes por *P. gingivalis* (KUBONIWA et al., 2009). Assim, a utilização de agentes que alteram a expressão do gene *fimA*, como extrato de tabaco, induziu a aumento na formação de biofilmes por *P. gingivalis* e foi associado com expressão reduzida 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*.

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.