Graziela Murta Barbosa

**Interações de isolados clínicos de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* com
Porphyromonas gingivalis na formação de biofilmes**

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

Graziela Murta Barbosa

**Interações de isolados clínicos de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* com
Porphyromonas gingivalis na formação de biofilmes**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Rodrigues

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
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

Barbosa, Graziela Murta.

Interações de isolados clínicos de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* com *Porphyromonas gingivalis* na formação de biofilmes / Graziela Murta Barbosa. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato.

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

Versão do título para o inglês: Interactions of clinical isolates of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* with *Porphyromonas gingivalis* in biofilm formation.

1. Biofilmes 2. *Prevotella intermedia* 3. *Prevotella nigrescens*
4. *Porphyromonas gingivalis* I. Simionato, Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0144/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Graziela Murta Barbosa.

Título da Tese: Interações de isolados clínicos de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* com *Porphyromonas gingivalis* na formação de biofilmes.

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

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

São Paulo, 27 de outubro de 2009.

PARECER 924 /CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 23.10.2009 **APROVOU** o projeto intitulado: "*Expressão gênica de isolados clínicos de Prevotella intermedia durante a formação de biofilmes*", sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. Maria Regina L. Simionato e a aluna Graziela Murta Barbosa.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em
23.10.2010

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO MARINHO ANDRADE ZANOTTO

Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO EM PESQUISA</p>
---	---

Decl. CEP SH. 038/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao PARECER 924 /CEP, de 27.10.2009, informo que o título do Projeto foi alterado para "Interações de isolados clínicos de Prevotella intermedia e Prevotella nigrescens com Porphyromonas gingivalis na formação de biofilmes" não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 08 de agosto de 2013.

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

Ao Guilherme, companheiro de muitas jornadas, e aos nossos filhos amados Mariana, Vitor e Luiza que acompanharam todos os meus passos nesta caminhada, incentivando e colaborando sempre com muito amor.

Aos meus pais Lúcia e Geraldo pela oportunidade da vida e aos familiares e amigos que entenderam as ausências e incentivaram a luta.

AGRADECIMENTOS

Ao “Pai Maior” que para mim constitui o princípio e a finalidade de minhas tarefas.

Às pessoas que fizeram parte da construção da minha tese ofereço meu agradecimento sincero.

À minha orientadora Profa. Regina pelo acolhimento e por me conduzir e amparar nos momentos mais delicados. Obrigada de coração.

Ao meu *co-orientador* Paulo Henrique que de coadjuvante, nada possui. Obrigada por me ensinar na prática a ser um ser humano melhor e por me conduzir com maestria nos caminhos da ciência.

À querida amiga e conselheira Profa. Andréa Colombo por seu grande incentivo, bom humor e por dividir comigo seus conhecimentos.

Às queridas amigas do laboratório Daniela Higashi e Luciana Kfourir, companheiras do “chão de fábrica”, das risadas e das angústias.

Aos amigos Melissa, Juliana, Vitor e Janaína pela ajuda indispensável no laboratório e pela alegria de sua juventude.

Às Profas. Márcia Mayer, Elisabete José Vicente e Silvana Cai por disponibilizarem seus laboratórios.

A todos os amigos do laboratório 110: Ericka, Priscila, Dione, Sílvia, Ellen e Lucas, por dividirem seu espaço de trabalho e por estarem por perto nos momentos de necessidade.

Aos amigos Léo e João por seu amparo técnico.

À Rosana Duarte por sua dedicação e paciência com as análises estatísticas.

Ao Roberto, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelas imagens de microscopia confocal.

Às secretárias Alice, Gisele, Beth e Naíde por todo apoio com a burocracia.

À Gláubia e Maria pelo apoio técnico ao meu lar.

À minha família pela sustentação e amparo fundamentais: Guilherme, Mari, Vitor, Lulu, à minha mãe Lucinha, meu pai Geraldo, ao Geraldão, Alexandre, Lane, Duda, Lucas, minha irmã Ana, Jairo, Pedro, Felipe, João, D.Aíla e tia Fatinha.

Todo o meu amor.

Grazi

“Não acrediteis em coisa alguma
Pelo fato de vos mostrarem o testemunho escrito
De algum sábio antigo;
Não acrediteis em coisa alguma
Com base na autoridade
De mestres e sacerdotes;
Aquilo, porém, que se enquadrar na
Vossa razão,
E depois de minucioso estudo
For confirmado pela vossa experiência,
Conduzindo ao vosso próprio bem
E ao de todas as outras coisas vivas;
A isso aceitai como verdade;
E daí, pautai vossa conduta!”

Buda

RESUMO

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

Prevotella intermedia e *Prevotella nigrescens* são espécies comumente associadas a doenças periodontais. Na cavidade oral, são frequentemente detectadas em biofilmes com outros patógenos orais, como *Porphyromonas gingivalis*. Poucos estudos investigaram a formação dos biofilmes de *P. intermedia* e *P. nigrescens* e principalmente suas associações com outros patógenos periodontais. Assim, os objetivos foram verificar a co-agregação entre cepas de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis*; quantificar a biomassa formada por estas associações; avaliar a proporção dos microrganismos nos biofilmes mistos; verificar a interferência do co-cultivo pela técnica de dois compartimentos, avaliar a estrutura dos biofilmes em ensaios de Hibridização In Situ (FISH) e verificar o papel dos genes PINA0102 e PIN0398 de *P. intermedia* na modulação do biofilme. Assim, nove isolados clínicos de *P. intermedia* e cinco de *P. nigrescens*, as cepas padrão *P. intermedia* 17, *P. intermedia* 25611, *P. nigrescens* 33563, *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* 33277 e as linhagens mutantes Pi17ΔPIN0398 e Pi17ΔPINA0102 foram crescidos em variados consórcios de duas cepas/linhagens. A associação *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* 33277 apresentou a maior coagregação e as associações de *P. nigrescens* 33563 com ambas cepas de *P. gingivalis* tiveram co-agregações quase nulas. Apesar de ter sido verificado a maior biomassa em monobiofilme para a *P. intermedia* 25611, a maior biomassa determinada foi a associação de *P. intermedia* 17 com *P. gingivalis* W83. Os biofilmes heterotípicos de *P. nigrescens* 33563 com as cepas de *P. gingivalis* apresentaram biomassa maior do que cada monobiofilme isoladamente. As biomassas dos heterobiofilmes dos isolados clínicos de *P. intermedia* com *P. gingivalis* W83 comportaram-se de maneira variada com relação ao monobiofilme do isolado clínico. Quando foram associados à *P. gingivalis* 33277, a maioria aumentou a biomassa evidenciando comportamento cepa-específico. Das interações dos isolados clínicos de *P. intermedia* com *P. nigrescens* 33563 foi verificado para a maioria um aumento da biomassa formada considerando-se o valor do monobiofilme do isolado clínico. Nas combinações das cepas clínicas de *P. nigrescens* com ambas as cepas padrão de *P. intermedia*, resultados variados foram verificados, enquanto que nas combinações com as duas cepas padrão de *P. gingivalis* as biomassas determinadas foram maiores que as verificadas nos respectivos isolados clínicos. Os resultados de proporcionalidade demonstraram domínio de *P. gingivalis* nos biofilmes mistos com *P. intermedia*, exceto a combinação de *P. intermedia* 17 com *P. gingivalis* W83. Nas combinações de *P. intermedia* com *P. nigrescens* 33563, proporcionalidades variadas foram encontradas. Porém, nas combinações de *P. nigrescens* com *P. gingivalis*, maior proporção desta foi determinada. Nos ensaios de dois compartimentos, *P. intermedia* foi beneficiada por *P. gingivalis*, enquanto que somente *P. gingivalis* 33277 foi beneficiada por estes co-cultivos. Os ensaios de FISH confirmaram os resultados obtidos na quantificação das biomassas das cepas padrão. Foi demonstrado que os genes PINA0102 e PIN0398 modulam a formação do biofilme de *P. intermedia* quanto à biomassa, proporção e no co-cultivo com cepas padrão de *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. Os resultados mostraram que as interações investigadas são cepa específicas merecendo investigações futuras para a elucidação dos mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: *Prevotella intermedia*. *Prevotella nigrescens*. *Porphyromonas gingivalis*. Biofilmes.

ABSTRACT

Barbosa GM. Interactions of clinical isolates of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* with *Porphyromonas gingivalis* in biofilms formation. [Ph. D. thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Prevotella intermedia and *Prevotella nigrescens* are commonly associated with periodontal diseases. In the oral cavity both species are frequently detected in biofilms associated with other periodontal pathogens, such as *Porphyromonas gingivalis*. Few studies have investigated biofilm formation of *P. intermedia* and *P. nigrescens* and their association with other periodontal pathogens. Thus, the goals of this study were to determine the co-aggregation of strains of *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *P. gingivalis*; to quantify the biomass of these associations, to evaluate the ratio of these microorganisms in heterotypic biofilms, to verify the modulation of biofilms in co-culture using a trans-well system; to evaluate the structure of the biofilms by Fluorescent Hybridization In Situ (FISH) and to determine the role of genes PINA0102 and PIN0398 of *P. intermedia* in the modulation of its biofilm. Therefore, nine clinical isolates of *P. intermedia*, five of *P. nigrescens*, type strains *P. intermedia* 17, *P. intermedia* 25611, *P. nigrescens* 33563, *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* 33277 and mutant strains Pi17ΔPIN0398 and Pi17ΔPINA0102 were grown in consortia of two strains. It was determined that the consortium *P. intermedia* 17 and *P. gingivalis* 33277 had the highest co-aggregation and the consortia of *P. nigrescens* 33563 with both strains of *P. gingivalis* had the lowest. Despite of *P. intermedia* 25611 produce the highest biomass in homotypic biofilm, the highest biomass in heterotypic biofilms has been verified for the consortium *P. intermedia* 17 and *P. gingivalis* W83. It was also determined that heterotypic biofilms of *P. nigrescens* 33563 with both strains of *P. gingivalis* had higher biomass than the respective homotypic biofilm of each strain. The biomasses of all associations of clinical isolates of *P. intermedia* with *P. gingivalis* W83 fluctuated when compared to each respective homotypic biofilm. When the clinical isolates were associated with *P. gingivalis* ATCC, most associations had an increased biomass which may demonstrate a strain-specific interaction. It also has been shown that most of the associations of clinical isolates of *P. intermedia* with *P. nigrescens* ATCC had an increase in biomass when compared to each respective homotypic biofilm. While a fluctuate biomass was verified in the consortia of clinical isolates of *P. nigrescens* with both type strains of *P. intermedia*, an increased biomass was verified for all associations of clinical isolates of *P. nigrescens* with both type strains of *P. gingivalis*. In addition, the ratio data of each strain in heterotypic biofilms have shown a higher mass of *P. gingivalis* in all consortia with *P. intermedia* strains except in the consortium of *P. intermedia* 17 and *P. gingivalis* W83. For the associations of *P. intermedia* with *P. nigrescens* ATCC a fluctuate ratio data have been determined, while a higher mass of both type strains of *P. gingivalis* has been determined in the consortia with *P. nigrescens*. In the two-compartment separated co-culture system *P. intermedia* had an increased biomass when co-cultured with *P. gingivalis* while only *P. gingivalis* ATCC had an increased biomass in this system. It was confirmed the biomass data of the type strains by the FISH assays. Genes PINA0102 and PIN0398 do modulate biofilm of *P. intermedia* regarding biomass, ratio in a heterotypic biofilm and in a co-culture system with type strains of *P. gingivalis* and *P. nigrescens*. Our data demonstrate that the associations of *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *P. gingivalis* are strain-specific and further investigations are necessary to elucidate the mechanism (s) involved in the interactions between these species.

Keywords: *Prevotella intermedia*. *Prevotella nigrescens*. *Porphyromonas gingivalis*.
Biofilms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Cepas bacterianas empregadas no estudo.....	23
3.2 Linhagens mutantes <i>P. intermedia</i> 17ΔPINA0102 e <i>P. intermedia</i> 17ΔPIN0398.....	24
3.3 Isolamento e identificação de <i>P. intermedia</i> e <i>P. nigrescens</i> de bolsas periodontais.....	24
3.4 Capacidade de coagregação entre cepas de <i>P. intermedia</i> e <i>P. nigrescens</i> com <i>P. gingivalis</i>.....	26
3.5 Avaliação da formação de biofilmes monotípicos e heterotípicos.....	27
3.6 Quantificação de <i>P. intermedia</i>, <i>P. nigrescens</i> e <i>P. gingivalis</i> nos biofilmes heterotípicos por PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR).....	28
3.7 Avaliação de formação de biofilmes monotípicos e heterotípicos em sistema de dois compartimentos.....	31
3.8 Hibridização <i>In Situ</i> por Fluorescência (FISH) e Microscopia Confocal.....	32
3.9 Análise Estatística.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Capacidade de autoagregação e coagregação.....	35
4.2 Quantificação da biomassa formada pela associação dos patógenos.....	42
4.3 Quantificação por PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR).....	48
4.4 Avaliação da formação de biofilmes monotípicos e heterotípicos em sistema de dois compartimentos.....	52

4.5 Hibridização <i>In Situ</i> por Fluorescência (FISH) e Microscopia confocal.....	56
4.6 Ensaios realizados com as linhagens mutantes <i>P. intermedia</i>17ΔPINA0102 e <i>P. intermedia</i> 17ΔPIN0398.....	61
4.6.1 Quantificação da biomassa	61
4.6.2 Quantificação por PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR).....	62
4.6.3 Co-cultura em sistema de dois compartimentos.....	64
5 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO A - Desenho esquemático que representa os complexos microbianos encontrados no biofilme oral.....	78
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	79

1 INTRODUÇÃO

Na natureza, as bactérias estão frequentemente presentes e associadas entre si na forma de biofilmes, que constituem aglomerados de microrganismos que formam comunidades compostas por múltiplas espécies ou predominantemente por um tipo específico que aderem a um substrato abiótico ou substrato vivo (Wright et al., 2013). A proximidade entre os microrganismos favorece as trocas metabólicas e envolve mecanismos específicos de adesão às superfícies e entre os microrganismos. A comunidade microbiana permanece envolvida por uma matriz de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos que lhes conferem facilidade de acesso a nutrientes, maior resistência à remoção mecânica e possibilidade de evasão as defesas do hospedeiro (Costerton et al., 1999; Kolenbrander et al., 2002; London, 1999; O'Toole, 2003; Wolcott et al., 2013).

Especialmente no biofilme oral, as centenas de espécies que colonizam a cavidade oral comumente se associam e coagregam dando origem à placa bacteriana. A formação deste biofilme ocorre com a adesão sucessiva dos microrganismos às superfícies orais e à superfície de outros microrganismos, ocorrendo o acúmulo das espécies. Com a reprodução microbiana e o recrutamento e inclusão de espécies adicionais, ocorre o amadurecimento do biofilme oral que se torna mais coeso e firmemente aderido às superfícies orais, dificultando sua remoção mecânica tanto pelo paciente quanto pelo cirurgião dentista. A placa dental ou biofilme oral é constituída por uma comunidade bacteriana interdependente e estruturada que apresenta arquitetura heterogênea, com áreas de alta densidade celular, envolvida por uma matriz extracelular (Davey, Costerton, 2006; Marsh et al., 2011). A presença de patógenos e as interações estabelecidas entre eles e o hospedeiro podem causar doenças através da instalação de um processo inflamatório e infeccioso na boca.

A complexidade do biofilme oral ocorre devido às interações entre as espécies e envolve mecanismos de coagregação entre colonizadores primários e tardios deste biofilme (Kolenbrander et al., 2010; Kuramitsu et al., 2007). Vários estudos destas associações entre os microrganismos estão descritos na literatura e revelam a importância das relações ecológicas estabelecidas entre eles (Abiko et al., 2010; Cugini et al., 2013; Holt, Ebersole, 2005). Byrne et al., 2013 demonstraram evidências de associações mutualísticas entre *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*.

As doenças periodontais têm muitas propriedades em comum com outras doenças infecciosas, entretanto apresentam propriedades únicas conferidas pelo local da colonização microbiana e a natureza do ambiente em que residem estes microrganismos (Amano, 2003; López, 2000; Socransky, Haffajee, 2002). A doença periodontal crônica acomete os tecidos de sustentação dos dentes, possui etiologia multifatorial e se associa à colonização da cavidade oral, principalmente por microrganismos anaeróbios Gram-negativos como *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* (Holt, Ebersole, 2005; Socranski, Haffajee, 1992). As interrelações estabelecidas entre as espécies que compõe o biofilme oral foram descritas por Socransky et al. (1998), que examinaram o biofilme subgengival de indivíduos com doença periodontal e também de indivíduos saudáveis. Tais estudos, realizados por análise de *clusters* (agrupamento de pares) e de similaridade, permitiram além do conhecimento das relações ecológicas estabelecidas entre as espécies que compõe o biofilme oral, também o agrupamento destas espécies em cinco complexos bacterianos, sendo eles: vermelho, laranja, verde, amarelo e azul e mais recentemente, o complexo roxo. Assim, microrganismos pertencentes ao complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) estabelecem interações ecológicas entre os vários complexos bacterianos, principalmente com o complexo laranja (ao qual pertencem *P. intermedia* e *Prevotella nigrescens*, entre outras espécies) no processo de sucessão microbiana que ocorre quando da formação do biofilme oral (Kolenbrander et al., 2010; Socransky, Haffajee, 2005). Segundo Cugini et al. (2013), a etiologia da doença periodontal seria melhor compreendida à luz das interações microbianas complexas que acontecem durante o processo de desenvolvimento desta comunidade que cresce e evolui em conjunto, tornando-se patogênica. A Figura 1 do Anexo A deste estudo ilustra o agrupamento em complexos das espécies encontradas no biofilme subgengival.

O gênero *Prevotella* compõe uma grande parte da microbiota da cavidade oral humana e é representado por bacilos anaeróbios Gram negativos, com colônias pigmentadas em preto quando cultivadas em ágar-sangue. São 13 espécies sacarolíticas ou moderadamente sacarolíticas, sendo *P. intermedia* e *P. nigrescens* as espécies mais prevalentes, frequentemente isoladas de placa subgengival de sítios com doença periodontal crônica e também da cavidade oral de indivíduos saudáveis (Socransky, Haffajee 2005; Yoshida et al., 2005a).

Shah e Gharbia (1990) propuseram uma nova espécie de *Prevotella*, nomeada *Prevotella nigrescens* e anteriormente classificada como *P. intermedia*. Estas duas espécies

são bioquimicamente similares e, portanto, devem ser identificadas por métodos moleculares que as diferenciem. Na falta desta diferenciação, ambas as espécies eram consideradas como grupo *P. intermedia* (Könönen et al., 2000), o que prejudicou o estabelecimento da relevância destes microrganismos na patogenia das doenças orais e não orais.

Na cavidade oral, *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram associadas não só com periodontite (Lopez, 2000; Socransky, Haffajee 2002; Ximénez-Fyvie et al., 2000; Zambon et al., 1981), mas também com gengivite ulcerativa necrosante aguda (Falkler et al. 1999), gengivite gravídica (Raber-Durlacher et al., 1994), periodontite em mulheres grávidas (Urban et al., 2010), lesões endodônticas (Baumgartner et al., 1999; Brook et al., 2006; Fukushima et al., 1990; Gomes et al., 2005) e doenças peri-implantares, principalmente nos seus estágios iniciais (Al-Radha et al., 2012). Outros estudos sugerem ainda um papel significativo para espécies de *Prevotella* em infecções polimicrobianas como o abscesso dental agudo (Robertson et al., 2009; Yanagisawa et al., 2006) e na disseminação de infecções odontogênicas, uma vez que em amostras de pus coletadas desses processos infecciosos, cerca de 50% das cepas encontradas pertenciam a esse gênero (Riggio et al., 2006).

Além da cavidade oral um papel importante tem sido atribuído a *P. intermedia* e *P. nigrescens* na patogenia de doenças cardiovasculares por sua capacidade de invasão às células de artérias coronárias humanas e pela sua detecção em placas ateroscleróticas (Dorn et al., 1999; Fiehn et al., 2005; Ford et al., 2006; Haraszthy et al., 2000; Hyvarinen, 2009; Kozarov et al., 2006; Taylor-Robinson et al., 2002). Estas espécies foram ainda associadas ao nascimento de bebês prematuros e/ou ao baixo peso ao nascimento (Buduneli et al., 2005). *P. nigrescens* também foi associada às doenças do trato respiratório (Cabrera-Rubio et al., 2012). Em estudo recente, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* foram isoladas de placa subgengival de pacientes cardiopatas com doença periodontal e foram significativamente associadas à esclerose da artéria carótica (Yakob et al., 2011).

Entre as duas espécies de *Prevotella*, *P. intermedia* é a espécie mais relacionada com periodontite (Könönen et al. 2000; Mättö et al. 1996). Apesar de *P. nigrescens* ser menos investigada que *P. intermedia* e vários relatos apontem seu isolamento a partir de sítios saudáveis (Dibart et al., 1998; Gharbia et al., 1994; Kuboniwa et al., 2004; Nadkarni et al., 2012; Sakamoto et al., 2004), associações com periodontite foram também estabelecidas (Gmur et al., 2002; Stingu et al., 2013).

Embora *P. intermedia* e *P. nigrescens* tenham uma relação bioquímica e filogenética próximas, o padrão de coagregação e formação de biofilme, podem ser fatores decisivos em se tratando de virulência dessas espécies, principalmente suas associações com *P. gingivalis* que constitui um patógeno clássico associado à etiologia da doença periodontal crônica. Segundo Kirschbaum et al. (2010) a diversidade dos componentes do consórcio microbiano presentes nas associações bacterianas pode modificar a capacidade de formação de biofilmes e, devido às interações estabelecidas entre os microrganismos, facilitar o processo invasivo no hospedeiro, contribuindo com o aumento do potencial de virulência da microbiota. Ademais, as espécies bacterianas regulam a expressão de vários genes em resposta à variação ambiental e aos estímulos intracelulares no desenvolvimento do biofilme (Lo et al., 2010) e alguns fatores de virulência são expressos somente durante a doença (Dolgilevich et al., 2011). Além da ligação direta entre adesinas e receptores, as espécies que compõe o biofilme também podem interferir na sua formação pela difusão de moléculas solúveis, que podem modular a formação do biofilme sem a necessidade de contato microbiano efetivo (Jenkinson, Lamont, 2005; Okuda et al., 2012a; Okuda et al., 2012b; Saito et al., 2008; Yoshida et al., 2005b).

Este grupo de microrganismos, formado por *P. intermedia* e *P. nigrescens*, possui diversos fatores associados à virulência que atuam na patogenia de doenças periodontais e de doenças sistêmicas. Espécies do gênero *Prevotella* possuem enzimas com atividades proteolíticas importantes como, por exemplo, a forte atividade de proteases (Gazi et al., 1995) e de fosfolipases (Bulkacz, Faull 2009). Possuem Interpaína A (InpA), uma cisteína-proteinase, capaz de inibir o sistema complemento do hospedeiro pela degradação do fator C3 (Potempa et al. 2009). *P. intermedia* produz ainda, dipeptidil dipeptidases que apresentam o potencial de remover resíduos de glicilprolina de moléculas de colágeno parcialmente degradado, em níveis semelhantes aos produzidos por *P. gingivalis* (Gazi et al. 1997). A importância da produção dessas enzimas proteolíticas reside no fato de que a destruição do tecido conjuntivo é um fator essencial ao desenvolvimento da periodontite crônica (Chen et al 1999; Eley, Cox, 2003; Jansen et al. 1995; Shibata et al 1993), interferindo diretamente na capacidade de invasão às células do hospedeiro, podendo ocasionar injúrias teciduais.

Além disso, espécies do gênero *Prevotella* produzem indol, um dos produtos voláteis do metabolismo, responsáveis pelo mau odor ou mau hálito (Sasaki-Imamura et al., 2011), que foi também associado à regulação do biofilme bacteriano (Lee et al., 2007) e das ilhas de patogenicidade em outras bactérias (Anyanful et al., 2005).

P. intermedia e *P. nigrescens* também apresentam atividade hemolítica pela produção de hemolisinas e hemaglutininas (Leung et al., 1996). Segundo Hamada et al. (1998), fimbrias de *P. intermedia* foram capazes de induzir a aglutinação de hemácias. As atividades hemolíticas e de hemaglutinação dessas espécies contribuiriam para aumentar a patogenicidade destes microrganismos, levando a um aumento dos níveis de ferro nos sítios periodontais, favorecendo assim, o crescimento bacteriano e ocasionando maior destruição dos tecidos (Beem et al., 1999; Okamoto et al., 1999; Silva et al., 2003; Guan et al., 2006).

Estudos *in vitro* demonstraram a presença de coagregação entre *P. intermedia* e *P. gingivalis* e mostraram que vesículas formadas a partir da membrana externa de *P. gingivalis* eram os constituintes envolvidos na agregação com células de *P. intermedia* (Kamaguchi et al., 2001; Kamaguchi et al., 2003). Um estudo recente revelou que algumas espécies do gênero *Prevotella* foram associadas ao aumento de profundidade de sondagem em sítios de doença periodontal, além de estarem fortemente associadas à presença de *P. gingivalis*, sugerindo um processo de co-colonização por ambos os patógenos nos sítios de doença (Nadkarni et al., 2012). Apesar da alta prevalência destas espécies de *Prevotella* (Socranski, Haffajee, 2005) muito pouco ainda é conhecido sobre a virulência destes componentes da microbiota subgengival especialmente da formação do biofilme heterotípico com *P. gingivalis*.

Adicionalmente, outro aspecto muito pouco investigado nas interações microbianas diz respeito à variabilidade que ocorre entre diferentes cepas da mesma espécie no seu padrão de colonização (Biyikoglu et al., 2012). Diferenças fenotípicas entre cepas padrão de *P. intermedia* são observadas, sendo que essas diferenças são marcantes no padrão de eficiência de interação e invasão às células do hospedeiro. Algumas características destas espécies já foram descritas na literatura por Hamada et al. (1998) e demonstraram que *P. intermedia* possui quatro tipos de fimbrias (tipos A, B, C e D). Segundo Gursoy e colaboradores (2009), a cepa padrão de *P. intermedia* ATCC 25611 invade pouco e possui fimbria tipo D. Já *P. intermedia* cepa 17, possui fimbria tipo C, ligada à hemaglutinação e provavelmente está envolvida com a capacidade de adesão e invasão às células do hospedeiro (Dorn et al., 1998; Hamada et al., 1998; Leung et al., 1999). *P. intermedia* 17, cujo genoma foi sequenciado pelo The Institute for Genomic Research (TIGR), atualmente nomeado J. Craig Venter Institute (JCVI), constitui um isolado clínico de bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica.

Tais diferenças genotípicas e fenotípicas entre cepas de *Prevotella* podem interferir na formação de biofilme por essas espécies, influenciando a colonização da cavidade oral. Assim, já foi demonstrado que algumas cepas de *P. intermedia* e *P. nigrescens* são capazes de produzir material viscoso polissacarídico, rico em manose, que contribui para a formação do biofilme e aumenta a resistência contra a resposta imune do hospedeiro (Yamanaka et al., 2009). Yamanaka et al. (2011), afirmaram que cepas de *P. intermedia* 17, produtoras de exopolissacarídeos (EPS), foram capazes de induzir abscessos em ratos numa quantidade equivalente a 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC), enquanto que *P. intermedia* ATCC 25611, *P. gingivalis* W83 e *P. gingivalis* ATCC 33277 requeriam uma quantidade equivalente a 10^9 de microrganismos, ou seja, 100 vezes mais, para induzir lesões por abscesso, detectáveis em ratos (Yamane et al., 2005).

A variabilidade genotípica e fenotípica também é documentada em cepas de *P. gingivalis*, que apresentam estrutura populacional heterogênea (Frandsen et al., 2001; Igboin et al., 2009). A análise de variados componentes de *P. gingivalis* associados à sua virulência como gengipaínas, lipopolissacarídeos (LPS), proteínas de membrana externa e produtos metabólitos revelam grande potencial invasivo e capacidade de disseminação sistêmica de cepas como *P. gingivalis* W83, consideradas virulentas (Dolgilevich et al., 2011; Neiders et al. 1989). Amano et al. (2004), relacionaram o tipo de fimbria de *P. gingivalis* com o potencial de virulência desta espécie. Segundo este estudo, *P. gingivalis* expressa dois tipos de moléculas fimbriais na sua superfície celular. Uma delas codificada pelo gene *fimA* chamada fimbria longa (FimA, classificada em seis tipos, I a V e I-b) e a outra consiste na subunidade menor Mfa, codificada pelo gene *mfa1*, conhecida como fimbria curta ou menor. Foram descritos na literatura seis tipos do polissacarídeos capsulares (antígeno K) de *P. gingivalis*, identificados como sorotipos K1-K6, ligados a virulência bacteriana (van Winkelhoff et al., 1993).

A presença de cápsula e de fimbrias nestes microrganismos está associada à severidade da infecção (Kuboniwa et al., 2010a). Assim, *P. gingivalis* W83 possui cápsula do tipo K1 e, fimbria do tipo IV, sendo pobremente fimbriada (*in vitro*), enquanto a cepa *P. gingivalis* ATCC 33277 é acapsulada (K0), possui fimbria tipo I, além de marcada habilidade de adesão a tecido hospedeiro e a componentes salivares, apresentando menor capacidade invasiva que *P. gingivalis* W83 (Amano, 2000, 2003, 2010; Chen et al., 2004; Duncan et al., 1993; Holt, Ebersole, 2005; Laine e van Winkelhoff, 1998; Lamont, Jenkinson, 1998).

Evidências indicam que a aderência bacteriana às mucosas e superfícies dentais e o processo de coagregação entre as espécies consistem em etapas fundamentais para a colonização da cavidade oral e estabelecimento da comunidade microbiana (Darveau et al., 1997). Deve-se considerar ainda que a primeira etapa de formação do biofilme oral consiste na aderência dos microrganismos a um substrato e as características coagregativas podem exercer papel fundamental neste arranjo. As bactérias periodontais, entre outras, possuem habilidade de interagir com outras bactérias por coagregação, que consiste num processo específico, envolvendo interações entre moléculas complementares da superfície bacterianas que funcionariam como adesinas e receptores. Portanto, através destas interações podem-se estabelecer relações sinérgicas ou de competição entre os componentes da microbiota associada ao biofilme (Kolenbrander, 1988; Levesque et al., 2003; Socransky, Haffajee 2002). Estudos realizados por Kamaguchi et al. (2003), demonstraram que a coagregação entre *P. gingivalis* e *P. intermedia* parece ser mediada por adesinas codificadas por genes que codificam para gingipaínas de *P. gingivalis*.

Segundo Amano 2010, adesinas fimbriais e não fimbriais presentes em espécies Gram negativas são sofisticadas e vão desde proteínas monoméricas simples a macromoléculas poliméricas que ativam uma complexa cascata de transdução de sinais nas células do hospedeiro, com diversas consequências, incluindo ativação das defesas inatas do hospedeiro ou a subversão do processo de defesa celular que facilitaria a invasão bacteriana. Algumas adesinas de *P. intermedia* 17, ligadas à fimbria do tipo C, responsáveis pela capacidade hemolítica e de hemaglutinação desta cepa já foram estudadas e por sua importância, merecem ser melhor investigadas. A análise da sequência genômica de *P. intermedia* 17 através de bases de dados, revelou a presença de múltiplos genes que codificam proteínas com similaridade a estas adesinas como o gene PIN0398, localizado cromossomo I desta bactéria que codifica para uma hemaglutinina, descrita na literatura como uma importante adesina fimbrial de *P. intermedia* 17 (Hamada et al., 1998; Leung et al., 1996)

Segundo Yu et al. (2006), *P. intermedia* 17 possui capacidade de aderir e invadir variados tipos celulares. Neste trabalho, a primeira proteína de superfície celular de *P. intermedia* 17 identificada e caracterizada por sua capacidade de ligação a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, foi nomeada proteína AdpB. Esta adesina não fimbrial, localizada no cromossomo II de *P. intermedia* 17, locus PINA0102, codifica para uma proteína do tipo invasina. Outra proteína de *P. intermedia* 17, do tipo internalina, a proteína

AdpC rica em repetições de leucina também teve investigado seu papel na adesão e invasão às células HUVECs (Human umbilical vein endotelial cells), segundo Iyer et al., 2010.

A variabilidade inter e intraespecífica do gênero *Prevotella* ainda é pouco estudada, merecendo uma investigação detalhada em relação ao padrão de formação de biofilme, assim como das interações que estabelecem com outros patógenos, especialmente com *P. gingivalis*. A contribuição das bactérias na progressão da doença periodontal e as interações ecológicas que ocorrem dentro de comunidades microbianas complexas como os biofilmes orais serão mais bem entendidas à medida que estudos de associações com outros patógenos presentes na cavidade oral sejam desenvolvidos e venham caracterizar melhor tais interações.

2 OBJETIVOS

Considerando a alta prevalência de *P. intermedia* e *P. nigrescens* em sítios subgengivais de pacientes com doença periodontal crônica, a importância clínica destes patógenos, bem como a frequente interação com cepas de *P. gingivalis*, este estudo objetiva investigar as interações entre cepas padrão e isolados clínicos de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* na modulação dos biofilmes heterotípicos. Para isso, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de autoagregação e de coagregação entre cepas de *P. intermedia* e *P. nigrescens* com *P. gingivalis*;
- quantificar biofilmes homotípicos e heterotípicos de cepas de *P. intermedia* e *P. nigrescens* com *P. gingivalis*;
- avaliar a proporção de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e de *P. gingivalis* nos biofilmes mistos através de PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR);
- quantificar a biomassa formada por cepas de *P. intermedia* e *P. nigrescens* com *P. gingivalis* pelo desenvolvimento dos heterobiofilmes em sistema de dois compartimentos;
- avaliar a estrutura e distribuição espacial de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* nos biofilmes, através de ensaios de Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH) e microscopia confocal;
- avaliar o papel dos genes PINA0102 e PIN0398 na formação de biofilmes homotípicos e heterotípicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas empregadas no estudo

Foram empregadas neste estudo as cepas padrão *P. intermedia* 17 e *P. intermedia* ATCC 25611, nove isolados clínicos de *P. intermedia*, as linhagens mutantes Pi17ΔPINA0102 e Pi17ΔPIN0398, a cepa padrão *P. nigrescens* ATCC 33563, cinco isolados clínicos de *P. nigrescens* e duas cepas padrão de *P. gingivalis*, cepas W83 e ATCC 33277, relacionadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Cepas bacterianas empregadas neste estudo.

Cepas Bacterianas	Origem
<i>Prevotella intermedia</i> 17	Fukushima et al., 1992
<i>Prevotella intermedia</i> 17Δ0102	Rodrigues et al., 2013
<i>Prevotella intermedia</i> 17Δ0398	Rodrigues et al., 2013
<i>Prevotella intermedia</i> 25611	ATCC
<i>Prevotella nigrescens</i> 33563	ATCC
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	ATCC
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 33277	ATCC
<i>Prevotella intermedia</i> 02	Este estudo
<i>Prevotella intermedia</i> 06	Este estudo
<i>Prevotella intermedia</i> 09	Este estudo
<i>Prevotella intermedia</i> 10	Este estudo
<i>Prevotella intermedia</i> 11	Este estudo
<i>Prevotella intermedia</i> 20	Este estudo
<i>Prevotella intermedia</i> 21	Este estudo
<i>Prevotella intermedia</i> 33	Este estudo
<i>Prevotella intermedia</i> 45	Este estudo
<i>Prevotella nigrescens</i> 12	Este estudo
<i>Prevotella nigrescens</i> 37	Este estudo
<i>Prevotella nigrescens</i> 44	Este estudo
<i>Prevotella nigrescens</i> 46	Este estudo
<i>Prevotella nigrescens</i> 108B	Este estudo

3.2 Linhagens mutantes *P. intermedia* 17 Δ PINA0102 e *P. intermedia* 17 Δ PIN0398

A análise da sequência genômica de *P. intermedia* 17 através de bases de dados, revelou a presença de múltiplos genes que codificam proteínas com similaridade a adesinas e que talvez possam influenciar a capacidade de formação de biofilme. Assim, foi utilizada neste estudo, uma linhagem mutante de *P. intermedia* 17 para o gene cujo *locus* é PIN0398, construída inicialmente para ser avaliada com relação à sua capacidade de adesão e invasão, *in vitro*, às células IHGK (Immortalized Human Gingival Keratinocytes), segundo Rodrigues et al., 2013.

Da mesma maneira, outra linhagem mutante de *P. intermedia* 17 para o gene que codifica para a proteína PINA0102, foi construída para se verificar o papel da proteína AdpB, que parece ser importante no processo de adesão e invasão às células do hospedeiro.

A construção das duas linhagens mutantes de *P. intermedia* 17, as cepas *P. intermedia* 17 Δ PINA0102 e *P. intermedia* 17 Δ PIN0398 que foram utilizadas neste estudo, foi realizada pelo co-orientador deste trabalho, o Prof. Dr. Paulo Henrique Rodrigues utilizando-se o plasmídeo pPR-UF2. Estas linhagens foram gentilmente cedidas para a avaliação do papel dos genes PINA0102 e PIN0398 na modulação de biofilmes homotípicos e heterotípicos. O *knock out* de ambos os genes foi realizado por substituição isogênica alélica (*double cross-over*) com o marcador de resistência à tetraciclina *tetQ*.

3.3 Isolamento e identificação de *P. intermedia* e *P. nigrescens* de bolsas periodontais

Foram isoladas e identificadas nove cepas de origem clínica de *P. intermedia* e cinco de *P. nigrescens*, do biofilme subgingival de indivíduos com doença periodontal crônica, selecionados na Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da USP.

A seleção dos indivíduos e coleta do material subgingival foi realizada sempre pelo mesmo periodontista, levando-se em conta parâmetros clínicos periodontais e critérios de exclusão estabelecidos na literatura (Armitage, 1999; Tonetti, Claffey, 2005). Para o diagnóstico de periodontite, os parâmetros clínicos foram definidos segundo a Academia Americana de Periodontologia (AAP, 2000) e incluíram: profundidade clínica de sondagem (PCS), nível clínico de inserção (NCI), sangramento à sondagem (SS), supuração (SUP) e presença de placa supragengival (PSP). A PCS foi mensurada por meio da sondagem manual circunferencial utilizando-se sonda periodontal de Williams (Hu-Friedy, MGF Co. Inc.,

Chicago, Estados Unidos). A PBS e o NCI foram avaliados em quatro sítios por dente: vestibular, mesial, distal e lingual ou palatino. Foram considerados para a coleta, os pacientes que preencheram os critérios clínicos de inclusão, apresentando periodontite crônica, isto é, com pelo menos quatro sítios com profundidade de sondagem e nível clínico de inserção $\geq$ 4mm, podendo ou não apresentar sinais de inflamação gengival. Os critérios de exclusão na seleção dos indivíduos foram: tratamento periodontal prévio, existência de doença sistêmica crônica, uso de medicamentos anti-microbianos ou antiinflamatórios nos últimos seis meses, estado de gravidez ou lactação. Todos os voluntários foram informados sobre a natureza do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). O estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICB/USP (Parecer 924/CEP de 23-10-2009).

Após a remoção do biofilme supragengival, foi preparado um “pool” do biofilme, coletado com o auxílio de cureta periodontal, de pelo menos três sítios subgengivais. O material clínico foi transferido para o meio de transporte VMGA III (Möller, 1966) com a finalidade de isolamento e identificação de *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Aliquotas de diluições seriadas do VMGA III foram semeadas em Ágar Brucella enriquecido com extrato de levedura (5,0 mg/ml), hemina (0,5 mg/ml), menadiona (1,0 mg/ml) e sangue desfibrinado de carneiro (5%) e incubadas a 37 °C durante 10 a 15 dias em câmara de anaerobiose (Coy Lab, Ann Arbor, Mich.), sob atmosfera de 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂. Após o desenvolvimento das culturas e análise da morfologia colonial em microscópio estereoscópico, as colônias pigmentadas de preto foram re-isoladas para a obtenção de culturas puras, que foram estocadas em solução de congelamento com 10% de glicerol a -80 °C, para posterior identificação.

A identificação dos isolados clínicos foi realizada por PCR usando iniciadores espécie-específicos baseados na sequência do gene 16S rRNA (Guillot et al., 1997), apresentados no Quadro 2. A extração de DNA dos isolados clínicos foi realizada através do Kit Wizard Genomic DNA (Promega). O ensaio de PCR foi desenvolvido numa mistura contendo 2,5 U/μl de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10 μM de cada oligonucleotídeo espécie-específicos (Quadro 2), 100 ng de DNA molde; 1,5 mM de MgCl₂ e 0,2 mM de cada de DNTP. Os parâmetros empregados para a amplificação foram: denaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 2 min. Cepas padrão de *P. intermedia* ATCC 25611 e *P. nigrescens* ATCC 33563 foram empregadas como controles positivo e *P. gingivalis* ATCC 33277 como controle negativo da reação.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1% contendo 0,01% de GelRed (Biotium) e fotografados para a verificação das bandas em fotodocumentador (DNR Bio Imaging Systems, Israel).

Quadro 2- Iniciadores de PCR empregados para a identificação dos isolados clínicos de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*

Espécies bacterianas	Sequências dos iniciadores (5' – 3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do produto (pb)
<i>Prevotella intermedia</i> ¹	CAGCACCCACAACGATATGA TTCCATCTTCTCTGCCTGTC	60° C	754
<i>Prevotella nigrescens</i> ¹	TTATGTTACCCGTTATGATGGAAG ATGGCGAAATAGGAATGAAAGTA	60° C	1100

Fonte: ¹ Guillot et al. (1997)

3.4 Capacidade de coagregação entre cepas de *P. intermedia* e *P. nigrescens* com *P. gingivalis*

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

Para isso, culturas das cepas padrão *P. intermedia* 17, *P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC 33563, *P. gingivalis* W83 e *P. gingivalis* ATCC 33277 foram crescidas em Todd Hewitt (Difco) enriquecido com extrato de levedura (5mg/ml), hemina (0,5 mg/ml) e menadiona (1,0 mg/ml), a 37 °C, em anaerobiose durante 12 h. As culturas foram coletadas por centrifugação a 3000 x g por 5 min, lavadas em tampão de coagregação composto por 1,0 mM tampão tris (pH 8,0); 0,1 mM de CaCl₂; 0,1 mM de MgCl₂ e 150 mM de NaCl e ressuspensas no mesmo tampão e mantidas a 37° C em aerobiose. Cada suspensão celular foi ajustada para uma densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm igual a 1.0 (DO₆₀₀ = 1,0). Volumes iguais (3,0 ml) de cada suspensão celular foram adicionados a cada um dos sete tubos de ensaio de vidro, correspondentes às leituras realizadas nos diferentes tempos. Assim, foi verificada a DO₆₀₀ no tempo zero (T0) e a cada hora, durante um período total de 6 h consecutivas. Para as leituras de densidade óptica, uma alíquota de 500 µl era removida, transferida para cubeta acrílica e a leitura realizada no espectrofotômetro (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburgo-Germany). Tubos contendo apenas o volume total de tampão de

coagregação serviram como controles negativos. Os ensaios de coagregação constituíram de três ensaios independentes, realizados em diferentes dias.

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

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

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

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

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

3.5 Avaliação da formação de biofilmes monotípicos e heterotípicos

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

Para isso, culturas de *P. intermedia* 17, *P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC 33563, *P. gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC 33277, das linhagens mutantes *P. intermedia* 17 Δ PINA0102 e *P. intermedia* 17 Δ PIN398, além dos isolados clínicos de *P. intermedia* e de *P. nigrescens*, foram desenvolvidas em Todd Hewitt (Difco), enriquecido com extrato de levedura (5mg/ml), hemina (0,5 mg/ml) e menadiona (1,0 mg/ml), a 37 °C, em anaerobiose durante 12 horas. Subcultivos foram realizados com a finalidade de padronizar as condições fisiológicas dos inóculos. Assim, a densidade óptica das culturas a 600nm (DO_{600})

foi ajustada para $DO_{600} = 0,5$ e após a incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em anaerobiose a DO_{600} foi checada e acompanhada até atingir $DO = 1,0$. Desta forma, foram estabelecidas condições de crescimento bacteriano de forma que todas as culturas estariam em fase logarítmica de seu crescimento. Assim, alíquotas de $500\text{ }\mu\text{l}$ das culturas foram distribuídas em quintuplicata em placas de 48 poços (Jet Biofil) contendo lamínulas de vidro (Knittel Glass, Germany) de 9 mm de diâmetro, para o desenvolvimento dos biofilmes monotípicos. Para a realização dos biofilmes mistos ou heterotípicos, foram combinadas alíquotas de $250\text{ }\mu\text{l}$ da cultura padronizada de cada par de espécies. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em anaerobiose durante 24 h para permitir a formação dos biofilmes. Para a evidenciação dos biofilmes e avaliação da biomassa, foi feita a aspiração da fração planctônica e os poços foram lavados com $500\text{ }\mu\text{l}$ de PBS pH $7,4$. Após nova aspiração, foram adicionados $100\text{ }\mu\text{l}$ de solução de safranina a $0,4\%$, que permite a coloração das células bacterianas. As placas foram incubadas por 15 min a temperatura ambiente e os biofilmes foram lavados três vezes por imersão em água destilada. Em seguida, foram descorados em $200\text{ }\mu\text{l}$ de etanol 95% . Após 15 min , $50\text{ }\mu\text{l}$ do etanol de cada biofilme foram transferidos, em triplicata, para os poços de placa de 96 poços e submetidos à leitura de absorbância em comprimento de onda de 490 nm (DO_{490}) em leitor de placas (Bio-Rad). Assim, foram obtidas quinze leituras de cada amostra.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (dp), obtidos em três ensaios independentes. Cada resultado corresponde à combinação de duas espécies associadas no biofilme heterotípico, sendo que tais associações foram realizadas sempre com duas espécies de cada vez, comparando-se as biomassas dos heterobiofilmes com as dos respectivos monobiofilmes. Os resultados foram considerados significantes quando o valor de p foi $< 0,05$.

3.6 Quantificação de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* nos biofilmes heterotípicos por PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR)

Para a quantificação de cada espécie nos biofilmes heterotípicos por q-PCR, além das cepas padrão de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis*, foram selecionados quatro isolados clínicos de *P. intermedia* e um isolado clínico de *P. nigrescens*. Tal escolha foi baseada nos resultados obtidos anteriormente por quantificação da biomassa formada. Desta forma, foram selecionadas as cepas que obtiveram resultados diferentes entre si quando associadas com espécies de *P. gingivalis* (W83 e ATCC 33277) e variados com relação ao eventual aumento ou diminuição da biomassa formada. Para avaliar se a mutação dos genes

PINA0102 e PIN0398 modificariam a quantificação relativa de cada espécie no biofilme heterotípico com *P. gingivalis*, as duas linhagens mutantes Pi17ΔPINA0102 e Pi17ΔPIN0398 foram igualmente investigadas.

Culturas de *P. intermedia* 17, *P. intermedia* ATCC 25611, isolados clínicos de *P. intermedia* (06, 09, 10 e 11), as linhagens mutantes *P. intermedia* 17Δ0102 e *P. intermedia* 17Δ0398, *P. nigrescens* ATCC 33563, isolado clínico *P. nigrescens* 37, *P. gingivalis* W83 e *P. gingivalis* ATCC 33277 foram desenvolvidas em Todd Hewitt (Difco) enriquecido com extrato de levedura (5mg/ml), hemina (0,5 mg/ml) e menadiona (1,0 mg/ml), a 37 °C, em anaerobiose durante 12 h. Subcultivos foram realizados conforme descrito anteriormente e alíquotas de 500 µl da cultura padronizada de cada par de espécies foram distribuídas em triplicata em placas de 24 poços (Jet Biofil), contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Knittel Glass, Germany), para o desenvolvimento dos biofilmes heterotípicos. As placas foram incubadas a 37 °C, em anaerobiose durante 24 h para permitir a formação dos biofilmes. Para a quantificação de espécies de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* nos biofilmes heterotípicos por q-PCR, três amostras independentes de DNA foram extraídas dos biofilmes heterotípicos, utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo as instruções do fabricante. Após a purificação em colunas do DNA extraído (PCR Purification Kit – Qiagen), 20 ng do DNA de cada amostra foi utilizado como molde para reação de PCR quantitativo.

No intuito de calcular a proporção de cada espécie participante do biofilme, foram utilizados iniciadores específicos para o gene *waaA*, que codifica a produção de lipolissacarídeo em *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* (Hyvarinen et al., 2009), conforme Quadro 3. Estes genes foram selecionados por se apresentarem em cópia única nas três espécies e conterem regiões específicas para cada uma das espécies.

Baseados no genoma de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis*, foi pesquisado um gene com sequência comum para estas espécies, e que se apresenta também em cópia única, com o objetivo de normalizar a reação. De todos os candidatos testados, o gene *thiC* (*locus* PINA0607) que codifica para proteína responsável pela síntese de tiamina, foi selecionado e os iniciadores desenhados estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Iniciadores empregados em ensaios de PCR em Tempo Real para a quantificação de *P. intermedia* e *P. gingivalis* em biofilmes mistos

Genes	Sequência dos iniciadores (5' – 3')	Tamanho do produto (pb)
<i>P. intermedia waaA</i> ¹	GACCCGAACGCAAAATACAT AGGGCGAAAAGAACGTTAGG	130
<i>P. gingivalis waaA</i> ¹	TGGTTTCATGCAGCTTCTTT TCGGCACCTTCGTAATTCTT	146
<i>P. nigrescens waaA</i> ²	GGCTGCTGGACACTCCAAGGCTTT GCTATGATGAGTTTCCACTCGCTGTG	120
<i>P. gingivalis/P. intermedia/P. nigrescens thiC</i> ²	ACGAYGCCAAYGATGCTGC ATCTTGTGCATBGGYACGTGTCC	124

Fonte: ¹ Hyvarinen et al., 2009; ² Este estudo

As reações de q-PCR foram realizadas utilizando 20 ng de DNA molde, numa mistura contendo pares de iniciadores (10 µM/µl), 2 x Fast Plus EvaGreen Mastermix (Biotium) e água até volume final de 20 µl. Nas reações de controle negativo das amplificações foi empregada água purificada no lugar do DNA bacteriano. As reações foram realizadas em triplicata.

A amplificação e a detecção foram realizadas em placas optical-grade, de 96 poços (BioRad) em um termociclador iCycler iQ (BioRad). Os parâmetros termo cíclicos empregados foram 95 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s (denaturação), 60 °C por 60 s (anelamento e extensão).

Uma curva de dissociação foi obtida em todos os produtos de amplificação, pelo aumento sucessivo de 0,4 °C na temperatura durante 10 s, e a análise da pureza do produto foi realizada comparando-se a temperatura de dissociação do produto específico com o perfil obtido da amplificação do produto purificado de PCR (10⁷ cópias) e dos controles negativos da amplificação.

A quantificação relativa de cada espécie nos biofilmes mistos foi calculada pelo software LinRegPCR (11.0), segundo o método desenvolvido por Ruijter (2009), que leva em consideração a eficiência da amplificação. Neste caso, foi utilizada a amplificação do gene *thiC* para normalizar os dados da referida reação. A quantificação relativa de cada espécie no biofilme heterotípico foi apresentada como porcentagem de cada microrganismo detectado.

3.7 Avaliação de formação de biofilmes monotípicos e heterotípicos em sistema de dois compartimentos

Dentro das comunidades bacterianas existem oportunidades de comunicação entre as espécies pela proximidade na qual se encontram e a sinalização celular pode ocorrer pelo contato direto entre as células, por cooperação metabólica ou por pequenas moléculas mediadoras que interferem neste processo de comunicação microbiana (Kuboniwa, Lamont, 2010). Para testarmos esta hipótese, foi investigado o comportamento dos biofilmes monotípicos e heterotípicos de cepas padrão de *P. intermedia* e *P. nigrescens* associadas às cepas padrão de *P. gingivalis*, sob o efeito de co-cultura em sistema de dois compartimentos. Foram testados também o comportamento dos biofilmes monotípicos e heterotípicos entre as linhagens mutantes com cepas de *P. gingivalis* (W83 e ATCC 33277) neste sistema de co-cultivo.

Os ensaios de formação de biofilme em sistema de co-cultura em dois compartimentos separados por um inserto contendo membrana com poros de 0,4 µm de diâmetro, foram realizados como descrito por Okuda et al., 2012 b, com modificações. Neste ensaio, duas diferentes suspensões bacterianas foram cultivadas simultaneamente, porém separadas por uma membrana porosa que permite a difusão de moléculas solúveis que poderiam modificar a capacidade de formação de biofilme das bactérias testadas.

Para isso, depois de estabelecidas as condições de cultivo dos microrganismos, alíquotas de 500 µl da suspensão bacteriana testada (*P. intermedia* 17, *P. intermedia* ATCC 25611, *P. intermedia* 17ΔPINA0102, *P. intermedia* 17ΔPIN0398 ou *P. nigrescens* ATCC 33563) foram distribuídas em triplicata em placas de 24 poços recobertos por lamínulas de vidro, designados como compartimento inferior. Um inserto (Cell Culture Insert, Becton Dickinson Co.) foi colocado em cada poço e designado como compartimento superior. Em seguida, 500 µl da suspensão padronizada da bactéria parceira (*P. gingivalis* W83 ou *P. gingivalis* ATCC 33277) foi colocado no compartimento superior.

As placas contendo as co-culturas foram incubadas por 24 h em anaerobiose. Após a incubação, o compartimento superior foi removido, a fração planctônica aspirada e o biofilme formado no compartimento inferior foi quantificado através da técnica de coloração por safranina.

O efeito da co-cultura de *P. intermedia* 17, *P. intermedia* ATCC 25611 e *P. nigrescens* ATCC 33563 nos biofilmes de *P. gingivalis* W83 ou *P. gingivalis* ATCC 33277 foi igualmente investigado, através do mesmo sistema de cultivo em dois compartimentos.

Como controle da formação de biofilme monotípico no compartimento inferior, foi utilizada a mesma suspensão bacteriana nos dois compartimentos, separados pela membrana.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

3.8 Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH) e Microscopia Confocal

A formação de biofilmes monotípicos e heterotípicos de *P. intermedia*, e *P. gingivalis* foi confirmada e ilustrada pelos ensaios de Hibridização *In Situ* (FISH) e Microscopia Confocal que possibilitaram também a determinação da espessura dos referidos biofilmes (Moter et al., 1998; Sunde et al., 2003; Capestany et al., 2008; Standar et al., 2010; Schillinger et al. 2012).

Para este ensaio, biofilmes foram desenvolvidos em lâminas de vidro (CultureSlides - BD Falcon). Culturas padronizadas das cepas *P. intermedia* 17, *P. intermedia* ATCC 25611, *P. gingivalis* W83 e *P. gingivalis* ATCC 33277 foram preparadas conforme descrito no item 3.4. Para o desenvolvimento dos monobiofilmes, os inóculos foram constituídos por 500 µl de cada suspensão, enquanto que para os biofilmes heterotípicos foram combinados 250 µl de cada espécie. Após 24 h, a fração planctônica foi aspirada e as células aderidas ao vidro foram fixadas com 500 µl de solução de formaldeído 3,7% (1 ml de formaldeído 35% em 9 ml PBS), por 12 h a 4 °C. As lâminas foram permeabilizadas com 200 µl de Triton X-100 0,5 % (BioBasic) a 37 °C, durante 10 min, em câmara úmida e depois lavadas com água destilada livre de nucleases.

Foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos desenhadas para a região gênica do 16S rRNA específicas para *P. gingivalis* (POGI) e *P. intermedia* (PRIN) conforme Sunde et al., 2003, descritas no Quadro 4. Para a solução de hibridização, 1,0 µl de cada sonda de foi diluído em 9,0 µl tampão de hibridização pré-aquecido (20 mM de Tris – HCl 1 M, 0,9 M de NaCl 5 M, 0,01% de SDS e 30% de formamida; pH 7,6) numa concentração de 50 ng/µl, preparadas a fresco. Foram adicionados 100 µl desta solução sobre as células aderidas ao vidro que permaneceram a 46 °C, em câmara escura e úmida por 2h.

Após este período, os biofilmes foram tratados com 200 µl de tampão de lavagem a 50°C por 15 min (20 mM de Tris-HCl 1M, 0,9 M de NaCl 5 M, 5 mM de EDTA, e 0,01% de SDS). Em seguida, as lâminas foram lavadas com 200 µl de água destilada estéril e secas em câmara escura, a temperatura ambiente. Uma alíquota composta de 10 µl do reagente “*Prolong Gold anti-fading*” (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) foi adicionada sobre as lâminas, antes da montagem e selamento das mesmas com lamínulas de vidro.

Quadro 4 - Sondas de oligonucleotídeos empregadas nos ensaios de FISH para *P. gingivalis* (POGI) e *P. intermedia* (PRIN).

Sonda*	Sequência (5' -3')	Espécie Bacteriana
POGI*	CAATACTCGTATCGCCCGTTATTC	<i>P. gingivalis</i>
PRIN**	CTTTACTCCCCAACAAAAGCAGTTTACAA	<i>P. intermedia</i>

* marcada com CY5 (Sulfoindocyanine dye – Bioneer, Alameda, CA, USA)

** marcada com FITC (Fluorescein isothiocyanate- Molecular Probes, Life Technologies, USA)

Fonte: Sunde et al., 2003

A microscopia confocal foi realizada em microscópio de fluorescência a laser (Axiovert,100M/LSM 510 Carls Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Seções variadas de escaneamento confocal (7-32) foram realizadas e obtidas imagens, designadas *z stacks* com espessuras variando de 0.5 – 1.0 µm. O processamento das imagens obtidas e a reconstrução bidimensional foram executados pelo uso do software ZEISS LSM IMAGE BROWSER, versão 3.5.0.223 (Carl Zeiss). A determinação da espessura dos biofilmes foi realizada selecionando-se o ponto médio das fatias (*z stack*) e a partir destes, os valores da espessura média foram calculados e apresentados como média ± desvio padrão.

3.9 Análise Estatística

Cada experimento realizado neste estudo foi executado no mínimo em triplicata e em dias diferentes. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar a quantidade de biomassa formada. O valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

A análise estatística foi aplicada para todos os ensaios de formação de biofilme, inclusive aos resultados obtidos pelo sistema de cocultura em dois compartimentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A doença periodontal crônica, que acomete principalmente indivíduos adultos, é multifatorial e está associada principalmente com a presença do patógeno *P. gingivalis* (Abiko et al., 2010; Ashimoto et al., 1996; Cugini et al., 2013; Kuboniwa et al., 2004; Socranski, Haffajee, 1992; Socranski, Haffajee, 2002). Porém, o entendimento do papel de patógenos como *P. intermedia* e *P. nigrescens*, que são bastante prevalentes em sítios subgingivais de pacientes com doença periodontal crônica (Socransky, Haffajee, 2005), pode ser importante para entender a evolução natural da doença periodontal e desta forma contribuir para o estabelecimento de um planejamento adequado ao tratamento da doença.

A estruturação do biofilme oral requer que os microrganismos presentes na cavidade bucal possuam mecanismos de adesão entre si e com as superfícies da boca como os dentes e tecidos moles, devido principalmente ao constante fluxo salivar e reflexos da deglutição que dificultam a instalação deste biofilme. Apesar da complexidade das várias espécies associadas neste consórcio microbiano, pode-se afirmar que seu estudo oferece a oportunidade de aprofundar conhecimentos a respeito das relações ecológicas estabelecidas entre os patógenos que o compõe. Segundo Kolenbrander (2010), o processo de colonização e desenvolvimento do biofilme oral constitui um dos sistemas mais bem descritos na natureza e envolvem as inter-relações estabelecidas entre os patógenos e o ambiente onde vivem.

Entretanto, o biofilme não constitui a mera somatória de seus patógenos constituintes e sua persistência ocorre pela diversidade encontrada na composição de seus membros e pelas inter-relações estabelecidas entre eles. Assim, apesar de existirem informações na literatura sugerindo uma co-colonização de *P. intermedia* com *P. gingivalis* em sítios doentes (Nadkarni et al., 2012), e de vários estudos que apontem a alta prevalência destes microrganismos, entre outros, em pacientes com doença periodontal (Abiko et al., 2010; Ashimoto et al., 1996; Hyvärinen et al., 2009; Yoshida et al., 2005), associações entre *P. nigrescens* e *P. gingivalis* ainda não foram adequadamente investigadas.

É importante ressaltar que estudos desta natureza são raros na literatura da Microbiologia Oral. Até onde conhecemos, nossos resultados estão entre os primeiros realizados para determinar a composição de biofilmes mistos de *P. intermedia* e *P. gingivalis*, e especialmente os de *P. nigrescens* e *P. gingivalis*.

Desta forma, objetivando aprofundar o conhecimento a respeito do biofilme heterotípico de cepas de *P. intermedia* quando associadas a cepas de *P. gingivalis*, este estudo foi desenvolvido através de ensaios *in vitro*: 1) para avaliar a capacidade de coagregação e a formação de biomassa bacteriana; 2) para investigar a proporcionalidade de cada patógeno no biofilme misto; 3) para realizar a inspeção visual do arranjo microbiano no biofilme por microscopia confocal; 4) para avaliar a formação de biomassa por co-cultivo sem contato físico entre as cepas e por fim 5) para verificar o papel de duas adesinas de *P. intermedia* na formação do biofilme.

4.1 Capacidade de autoagregação e coagregação

Dentre os fenômenos de associações bacterianas, a coagregação é um processo definido pelo reconhecimento entre as moléculas de superfície de dois diferentes tipos de células bacterianas, a fim de que um agregado de células misturadas seja formado, podendo até mesmo ser observado a olho nu. As interações que ocorrem são específicas e dependem dos tipos celulares agregados, a viabilidade dos microrganismos não é necessariamente exigida e este processo envolve interações entre superfícies celulares dos microrganismos e adesinas por eles secretadas (Amano, 2010; Kinder, Holt, 1994; Kolenbrander et al., 2006; Rickard et al., 2003).

Embora sejam consideradas interações entre superfícies microbianas, os fenômenos podem ser diferenciados na dependência das condições em que ocorrem. Assim, quando um microrganismo associa-se a outro que se encontra imobilizado em um substrato, o fenômeno é chamado de coadesão. Quando esta ligação ocorre entre microrganismos em suspensão, ou no estado planctônico, tem-se a coagregação, que constitui uma primeira etapa no processo de desenvolvimento do biofilme. Sendo assim, a capacidade de coagregação entre cepas padrão de *P. intermedia*, *P. nigrescens* com cepas de *P. gingivalis* foi investigada com o objetivo de verificar a afinidade que existe entre as cepas testadas, uma vez que o reconhecimento de componentes da superfície bacteriana que poderiam interferir na formação da biomassa e também na sua composição.

A análise visual amplamente descrita na literatura que atribui escores de 0 a 4 (0: nenhuma mudança na turbidez e nenhuma coagregação detectada visualmente; 1: ligeira e dispersa turbidez; 2: coagregação visível e definitiva, mas não estabelecida imediatamente; 3: formação de coagregados imediatos, porém com turbidez no sobrenadante; 4: máximo de

formação de coagregados com sobrenadante claro, aquoso) para o índice de coagregação entre os espécimes é subjetiva e sujeita a percepção do observador (Cisar et al., 1979; Kolenbrander, 1988; Shen et al., 2005). No presente estudo foi utilizada a análise da absorbância obtida por densidade óptica para medir o grau de coagregação entre as cepas testadas, uma vez que evita a influência subjetiva do observador.

Ensaio de melhoramento do protocolo para coagregação realizados preliminarmente a este estudo demonstraram serem as primeiras seis horas de contato suficientes e fundamentais para entendermos o comportamento das cepas estudadas, quando associadas. A literatura sugere que a porcentagem de coagregação seja calculada após os 60 min iniciais do contato entre as bactérias (Shen et al., 2005). Entretanto, neste estudo, optamos por um acompanhamento durante um período de tempo maior para observarmos o comportamento das cepas.

Com o intuito de visualizar e acompanhar o processo de coagregação entre espécies de *Prevotella* associadas a cepas de *P. gingivalis*, ao longo do tempo, os resultados correspondentes às medidas de DO nas primeiras 6 h de contato foram representadas em forma de gráficos. Para facilitar a leitura e análise dos resultados, os valores da DO foram modificados usando a fórmula a seguir $[(\log DO) \times (-1)]$.

A Figura 1 representa os resultados da coagregação de cepas de *P. intermedia* 17 e *P. intermedia* ATCC 25611 com *P. gingivalis* W83.

Figura 1- Capacidade de coagregação entre cepas de *Prevotella intermedia* 17 e *Prevotella intermedia* ATCC 25611 com *Porphyromonas gingivalis* W83.

Nesta figura, podemos observar que *P. gingivalis* W83 é a cepa que apresenta menor potencial de autoagregação e a cepa *P. intermedia* ATCC 25611, ao contrário, foi a que mais autoagregou entre os espécimes testados. A coagregação obtida pela associação de *P. gingivalis* W83 com *P. intermedia* ATCC 25611 apresentou comportamento intermediário entre os valores da autoagregação de cada cepa que compõe o conjunto. Desta forma, podemos inferir que existem três possibilidades para explicar este fenômeno: 1) a coagregação entre estas duas espécies ocorre, porém com uma eficiência de interação menor que a capacidade autoagregativa de *P. intermedia* ATCC 25611; 2) e *P. gingivalis* W83 poderia ser a responsável pela diminuição do valor de $[(\log DO) \times (-1)]$ obtido da associação, pois sua presença impediria ou dificultaria a autoagregação de *P. intermedia* ATCC 25611; 3) apesar de haver a autoagregação de *P. intermedia* ATCC 25611, novamente a presença de *P. gingivalis* W83, por sua baixa capacidade autoagregativa poderia tornar o meio turbido, mantendo o baixo valor de $[(\log DO) \times (-1)]$ desta associação. Já a associação de *P. intermedia* 17 com *P. gingivalis* W83 tem maior capacidade de coagregar-se que cada cepa individualmente.

Ensaio de coagregação foram também realizados entre cepas de *P. intermedia* com *P. gingivalis* ATCC 33277. Os resultados estão apresentados na Figura 2.

Figura 2- Capacidade de coagregação entre cepas de *Prevotella intermedia* 17 e *Prevotella intermedia* ATCC 25611 com *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Este gráfico permite-nos observar que a associação entre *P. intermedia* 17 com *P. gingivalis* ATCC 33277 foi o conjunto que apresentou maior capacidade de coagregação do que cada cepa individualmente. *P. intermedia* 17 apresentou um comportamento similar nas interações com cepas de *P. gingivalis*, porém na interação com *P. gingivalis* W83 a coagregação foi inferior a coagregação com *P. gingivalis* ATCC 33277. Este comportamento evidencia uma interação positiva entre *P. intermedia* 17 com as cepas de *P. gingivalis* avaliadas.

A associação de *P. intermedia* ATCC 25611 com *P. gingivalis* ATCC 33277 foi semelhante ao resultado da interação *P. intermedia* ATCC 25611 e *P. gingivalis* W83, descrita anteriormente. O conjunto formado por *P. intermedia* ATCC 25611 com *P. gingivalis* ATCC 33277 obteve valor de $[(\log DO) \times (-1)]$ intermediário entre os valores de

autoagregação de cada cepa individualmente. Desta forma, novamente pode ter ocorrido os três cenários descritos anteriormente na coagregação de *P. intermedia* ATCC 25611 com *P. gingivalis* W83. Diferente do observado para *P. intermedia* 17 com ambas as cepas de *P. gingivalis*, *P. intermedia* ATCC 25611 aparentemente demonstrou uma capacidade menor de coagregar com ambas cepas de *P. gingivalis*, evidenciando uma variação intraespecífica desta espécie.

Assim, torna-se evidente que a capacidade de coagregação entre cepas de *P. intermedia* com cepas de *P. gingivalis* é variável, de acordo com o tipo de cepa associada e sendo assim poderia influenciar a capacidade de formação de biofilme destas cepas.

Para avaliar se existe também variabilidade com relação às cepas de *P. gingivalis* quando associadas a *P. nigrescens* ATCC 33563, foram realizados ensaios de coagregação entre estas espécies e os resultados estão apresentados na Figura 3.

Figura 3- Capacidade de coagregação de *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 com *Porphyromonas gingivalis* W83 e com *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

As mesmas cepas de *P. gingivalis* analisadas anteriormente, quando interagiram com *P. nigrescens* ATCC 33563 comportaram-se de maneira semelhante com o comportamento observado de *P. intermedia* ATCC com ambas *P. gingivalis*, ou seja, o par *P. nigrescens* ATCC 33563 e *P. gingivalis* W83 e o par *P. nigrescens* ATCC 33563 e *P. gingivalis* ATCC

33277 tiveram ambos os comportamento intermediário de coagregação em relação à capacidade individual de cada cepa de autoagregar-se, a semelhança do discutido anteriormente para cepas de *P. intermedia* com cepas de *P. gingivalis*, observando que na associação *P. nigrescens* ATCC 33563 com *P. gingivalis* ATCC 33277, o comportamento intermediário verificado ocorreu provavelmente pela interferência de *P. nigrescens* ATCC 33563 neste processo, já que *P. gingivalis* ATCC 33277 apresentou maior capacidade de autoagregação entre elas.

A análise desta figura permite-nos observar que a associação entre *P. nigrescens* ATCC 33563 e cepas de *P. gingivalis* revelou valores inferiores aos obtidos entre cepas de *P. intermedia* e cepas de *P. gingivalis*.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados das porcentagens de autoagregação e de coagregação de cepas de *P. intermedia* com cepas de *P. gingivalis* e também de *P. nigrescens* ATCC 33563 com cepas de *P. gingivalis*, após 6 h de suspensão em tampão de coagregação.

Tabela 1 – Porcentagem de autoagregação e de coagregação de espécies de *Prevotella intermedia* 17, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Porphyromonas gingivalis* W83, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 e *Prevotella nigrescens* ATCC 33563.

Cepas associadas	T6h
<i>P. intermedia</i> 17	26,6%
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	77,9%
<i>P. gingivalis</i> W83	3,6%
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	40,8%
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	24%
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611 x <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	32.15%
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611 x <i>P. gingivalis</i> W83	27.29%
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	78.14%
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. gingivalis</i> W83	20.57%
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563 x <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	0%
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563 x <i>P. gingivalis</i> W83	0%

cálculo da porcentagem de autoagregação e coagregação, segundo Shen et al. (2005)

Podemos observar que *P. intermedia* ATCC 25611 foi a cepa que apresentou maior porcentagem de autoagregação (77,9%), seguida por *P. gingivalis* ATCC 33277 (40,8%), *P. intermedia* 17 (26,6%), *P. nigrescens* ATCC 33563 (24%) e *P. gingivalis* W83 (3,6%).

Entre as associações realizadas, o par *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* ATCC 33277 (78,14%) foi o que apresentou melhor capacidade de coagregação, seguido pelo par *P. intermedia* 17 com *P. gingivalis* W83 (20,57%). As coagregações de *P. nigrescens* ATCC 33563 com cepas de *P. gingivalis* foram praticamente nulas.

Apesar de *P. nigrescens* ATCC 33563 não apresentar grande capacidade de autoagregação, quando associada a cepas de *P. gingivalis*, o comportamento da associação foi praticamente nulo, pois a leitura de DO do par *P. nigrescens* ATCC 33563 e *P. gingivalis* W83 foi menor que os valores de autoagregação de *P. nigrescens* ATCC 33563. No caso do par *P. nigrescens* ATCC 33563 e *P. gingivalis* ATCC 33277 os valores de coagregação foram menores que os valores de autoagregação de *P. gingivalis* ATCC 33277, evidenciando que as interações parecem ter ocorrido à custa da capacidade autoagregativa de uma das cepas associadas.

Em estudo recente, Sato e Nakazawa (2012) avaliaram a capacidade de coagregação entre *Prevotella oris* e nove espécies de bactérias orais, entre elas *P. gingivalis* ATCC 33277 e *P. intermedia* ATCC 25611. Os autores empregaram um método visual de avaliação que não lhes permitiu verificar sequer a autoagregação de *P. gingivalis* ATCC 33277 e de *P. intermedia* ATCC 25611 identificadas em nosso estudo. Além disso, verificaram que o processo de coagregação entre *P. oris* e *P. gingivalis* não foi inibido por açúcares ou EDTA, mas inibido por Na-p-tosyl-L-lysine (TLCK), indicando o envolvimento das gingipaínas, as principais proteinases de *P. gingivalis*, nesse processo. Estes autores concluíram que *P. oris* pode ser capaz de favorecer a colonização por *P. gingivalis* nos estágios iniciais de formação de biofilme e afirmaram que a coagregação pode contribuir para o início e progressão da doença periodontal (Sato e Nakazawa, 2012). Em outro estudo, coagregação entre *P. intermedia* e *P. gingivalis* foi também relacionada aos genes codificadores das gingipaínas (Kamaguchi et al., 2003), demonstrando que estudos adicionais ainda devem ser realizados com o objetivo de esclarecer os fatores envolvidos na coagregação dos diferentes pares de patógenos subgingivais analisados no presente estudo.

4.2 Quantificação da biomassa formada pela associação dos patógenos

Para a quantificação da biomassa formada entre os patógenos associados no biofilme heterotípico utilizou-se o sistema experimental bem estabelecido na literatura de formação de biofilme em superfície abiótica, por ensaios realizados em placas de 48 poços. A análise é semi-quantitativa, realizada a partir da solubilização do corante, utilizado para caracterizar a biomassa formada, segundo O'Toole e Kolter (1998) e Capestany et. al. (2008).

Os resultados de quantificação de biomassa apresentados neste estudo mostram que todas as cepas padrão e isolados clínicos de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* apresentaram a capacidade de formação de biofilme, segundo critérios determinados por Standar et al. (2010), que estabeleceram que a leitura de densidade óptica (DO), que mede a absorbância, $DO_{490nm} > 0,05$, indica a formação de biofilme e é normalmente utilizada para medir a biomassa bacteriana formada em condições estáticas.

Os resultados dos ensaios de formação de biofilme entre cepas padrão e entre isolados clínicos de *P. intermedia* com *P. gingivalis* estão apresentados na Figura 5.

Figura 5- Quantificação (DO_{490nm}) da biomassa formada entre isolados clínicos de cepas de *Prevotella intermedia* com cepas de *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens*.

Os resultados são os valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão.

* comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico dos isolados clínicos, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

+ comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico das cepas padrão, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

a: comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico da primeira cepa padrão, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

b: comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico da segunda cepa padrão, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

Entre as cepas padrão, a que apresentou maior biomassa quando em biofilme monotípico foi *P. intermedia* ATCC 25611 ($0,293 \pm 0,05$), seguida por *P. intermedia* 17 ($0,218 \pm 0,07$), *P. gingivalis* ATCC 33277 ($0,099 \pm 0,02$), *P. nigrescens* ATCC 33563 ($0,088 \pm 0,01$) e *P. gingivalis* W83 ($0,066 \pm 0,01$), sendo esta última cepa, a pior formadora de biofilme entre todas as cepas testadas no estudo.

Entre os biofilmes heterotípicos das cepas padrão merece destaque a associação de *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* W83 ($0,538 \pm 0,04$), cujo aumento foi de 2,5 vezes em relação à biomassa de *P. intermedia* 17 ($0,218 \pm 0,07$) e de 8 vezes em relação à biomassa de *P. gingivalis* W83 ($0,066 \pm 0,01$). Esta interação foi a que obteve maior biomassa formada entre os heterobiofilmes de cepas padrão testados. A associação de *P. intermedia* 17 com *P. gingivalis* ATCC 33277 não foi igualmente favorecida. Neste biofilme misto, houve aumento da biomassa em relação ao monobiofilme de *P. gingivalis* ATCC 33277 ($0,099 \pm 0,02$ para $0,168 \pm 0,02$). Porém, *P. intermedia* 17 apresentou menor biomassa no heterobiofilme em relação ao monobiofilme desta ($0,218 \pm 0,07$ para $0,168 \pm 0,02$).

Apesar de *P. intermedia* ATCC 25611 constituir a cepa produtora de maior biomassa em monobiofilme ($0,293 \pm 0,05$), os heterobiofilmes com cepas padrão de Pg produziram menor biomassa em relação ao seu monobiofilme. Quando associada a *P. gingivalis* W83 o valor da biomassa foi $0,093 \pm 0,02$, sendo este valor maior que o monobiofilme de *P. gingivalis* W83 ($0,066 \pm 0,01$). Porém, houve redução de mais de três vezes na biomassa formada quando comparada aos valores de monobiofilme de *P. intermedia* ATCC 25611. Portanto, diferentemente de *P. intermedia* 17, a cepa *P. intermedia* ATCC 25611 quando associada a *P. gingivalis* W83 apresentou um biofilme com biomassa mais delgada que a associação anterior.

A associação de *P. intermedia* ATCC 25611 com *P. gingivalis* ATCC 33277 apresentou um valor de biomassa de $0,149 \pm 0,02$, formando um heterobiofilme maior que o monobiofilme de *P. gingivalis* ATCC 33277 ($0,099 \pm 0,01$), porém menor que o monobiofilme de *P. intermedia* ATCC 25611 ($0,293 \pm 0,05$), seguindo o mesmo padrão de comportamento da associação com a cepa *P. gingivalis* W83.

O comportamento das duas cepas de *P. intermedia* quando associadas com *P. gingivalis* ATCC 33277 foi bastante semelhante, mantendo o mesmo padrão. Resumidamente, os heterobiofilmes constituíram-se de biomassa maior que o monobiofilme da cepa de *P. gingivalis* ATCC 33277. Em contrapartida, estes mesmos heterobiofilmes apresentaram

biomassa menor que os monobiofilmes das cepas de *P. intermedia* 17 e ATCC 25611. Estes resultados evidenciam que estas interações parecem ter uma associação positiva para *P. gingivalis* ATCC 33277.

Os resultados da biomassa dos biofilmes homotípicos nos permite uma possível correlação com os dados de autoagregação, uma vez que a mesma ordem decrescente verificada na autoagregação para as cepas padrão foi observada nos valores de biomassa dos monobiofilmes (*P. intermedia* ATCC 25611 > *P. intermedia* 17 > *P. gingivalis* ATCC 33277 > *P. nigrescens* ATCC 33563 > *P. gingivalis* W83), confirmando o importante papel da autoagregação na modulação do biofilme homotípico preconizada pela literatura (Okuda et al., 2012a; Okuda et al., 2012b; Sato, Nakazawa, 2012). Entretanto, a mesma correlação não foi verificada com os biofilmes heterotípicos. Assim, estes resultados indicam que houve variabilidade intra-específica com relação ao padrão de comportamento de coagregação e de formação de biofilme entre as associações de cepas de *P. intermedia* com cepas *P. gingivalis*.

Com relação aos biofilmes de isolados clínicos de *P. intermedia* verificou-se que apesar de todos serem capazes de formar biofilme, o monobiofilme destes isolados sempre foi menor que os das cepas *P. intermedia* 17 e *P. intermedia* ATCC 25611.

Entre os biofilmes heterotípicos de isolados clínicos de *P. intermedia* com *P. gingivalis* W83 todos apresentaram biomassa maior que o monobiofilme de *P. gingivalis* W83, uma vez que esta cepa apresentou a menor biomassa dentre todas as cepas testadas em todas as condições.

Os valores de biomassas dos isolados clínicos de *P. intermedia* com *P. gingivalis* W83 foram variados: 3/9 foram menores, 5/9 mantiveram-se iguais e 1/9 aumentou em relação ao monobiofilme do isolado clínico. Quando estes mesmos isolados clínicos foram associados à *P. gingivalis* ATCC 33277, a maioria deles, ou seja, 7/9 aumentaram a biomassa e 2/9 permaneceram iguais ao seu monobiofilme, evidenciando um comportamento cepa-específico. Em todos os heterobiofilmes dos isolados clínicos de *P. intermedia* com cepas de *P. gingivalis* foram identificados uma maior biomassa que os monobiofilmes de *P. gingivalis*, sugerindo uma interação positiva para *P. gingivalis*.

Das associações entre isolados clínicos de *P. intermedia* com *P. nigrescens* ATCC 33563 também obtivemos resultados variados, em 4/9 houve aumento da biomassa formada, 4/9 mantiveram-se relativamente iguais e 1/9 apresentou menor biomassa considerando-se os valores dos monobiofilmes dos isolados clínicos. No entanto, todas estas associações

formaram maior biomassa que o monobiofilme de *P. nigrescens* ATCC 33563, da mesma forma que as interações anteriores, também sugerindo uma interação positiva para *P. nigrescens*.

Os resultados dos ensaios de formação de biofilme entre isolados clínicos de *P. nigrescens* com cepas padrão de *P. gingivalis* estão apresentados na Figura 6.

Figura 6- Quantificação (DO_{490nm}) da biomassa formada entre isolados clínicos de *Prevotella nigrescens* com cepas padrão de *Porphyromonas gingivalis*.

Os resultados são os valores médios e as barras de erro representam o desvio padrão.

* comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico dos isolados clínicos, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

+ comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico das cepas padrão, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

a: comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico da primeira cepa padrão, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

b: comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico da segunda cepa padrão, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

Na associação de *P. nigrescens* ATCC 33563 com *P. intermedia* 17 houve um aumento da biomassa do heterobiofilme em relação ao monobiofilme de *P. nigrescens* ATCC 33563 ($0,088 \pm 0,01$ para $0,153 \pm 0,02$), sendo que a biomassa de *P. intermedia* 17 apresentou valor menor que seu monobiofilme ($0,218 \pm 0,07$ no monobiofilme e $0,153 \pm 0,02$ no biofilme misto). A interação entre *P. nigrescens* ATCC 33563 e *P. intermedia* ATCC 25611 ocorreu da mesma forma que a anterior. Foi observado um aumento na biomassa do biofilme misto em relação ao monobiofilme de *P. nigrescens* ATCC 33563 ($0,150 \pm 0,01$ no heterobiofilme e $0,088 \pm 0,01$ no monobiofilme) e um valor menor da biomassa do monobiofilme de *P. intermedia* ATCC 25611 (de $0,293 \pm 0,05$ no monobiofilme). O comportamento observado entre *P. nigrescens* ATCC 33563 e cepas padrão de *P. intermedia* foi o mesmo das interações entre isolados clínicos de *P. intermedia* e a cepa *P. nigrescens* ATCC 33563, ou seja, o heterobiofilme teve maior biomassa que o monobiofilme de *P. nigrescens* ATCC 33563, indicando que *P. nigrescens* tenha sido beneficiada nestas interações.

Quando as associações foram feitas entre *P. nigrescens* ATCC 33563 e *P. gingivalis* W83 ($0,134 \pm 0,01$ no biofilme misto), as biomassas dos biofilmes heterotípicos foram maiores em relação aos monobiofilmes de ambas as cepas. Para *P. gingivalis* W83 a biomassa foi 2,0 vezes maior em relação ao seu monobiofilme ($0,066 \pm 0,01$) e 1,5 vezes maior que o monobiofilme de *P. nigrescens* ATCC 33563 ($0,088 \pm 0,01$). Da associação *P. nigrescens* ATCC 33563 com *P. gingivalis* ATCC 33277 ($0,178 \pm 0,06$), as biomassas foram 1,8 vezes maior em relação ao monobiofilme de *P. gingivalis* ATCC 33277 ($0,099 \pm 0,02$) e duas vezes maior que o monobiofilme de *P. nigrescens* ATCC ($0,088 \pm 0,01$). Os biofilmes heterotípicos de *P. nigrescens* ATCC 33563 com as cepas de *P. gingivalis* apresentaram biomassa maior do que cada monobiofilme isoladamente, sugerindo um benefício às duas espécies de patógenos neste biofilme, tanto para *P. nigrescens* quanto para as duas cepas de *P. gingivalis*.

Quanto aos isolados clínicos de *P. nigrescens*, foi observado para todas as associações com *P. gingivalis* maior biomassa do que os respectivos monobiofilmes de ambas as cepas de *P. gingivalis* e dos isolados clínicos, sugerindo uma possível associação positiva entre estas duas espécies. Quando associados com as cepas padrão de *P. intermedia*, foi observado uma variação nos valores das biomassas dos consórcios, mostrando uma variabilidade de comportamento, o que pode indicar uma interação cepa específica.

As Figuras 5 e 6 mostram ainda que todos os isolados clínicos de *P. intermedia* e *P. nigrescens* quando associados às cepas de *P. gingivalis* promoveram maior biomassa em

relação aos monobiofilmes de *P. gingivalis*, evidenciando uma associação positiva para *P. gingivalis*.

A associação de *P. gingivalis* com outros patógenos orais e sua consequente vantagem competitiva pode ser um dos fatores que contribuiriam para aumentar o potencial patogênico de *P. gingivalis* no biofilme oral. A literatura existente já demonstrou que existem associações de *P. gingivalis* com *P. intermedia* no aumento da profundidade da bolsa periodontal (Nadkarni et al., 2012) e na aquisição facilitada de ferro por *P. gingivalis* devido à atividade proteolítica de interpaína A de (InpA) de *P. intermedia* (Byrne et al., 2013).

Com relação à capacidade de formação de biofilme *in vitro*, observamos que as associações apresentaram comportamento variável, possivelmente devido às características fenotípicas distintas das cepas que poderiam modificar os padrões de adesão e coagregação envolvidos nos processos de formação dos biofilmes orais. A literatura é vasta em se tratando de *P. gingivalis*, entretanto é bastante medíocre para os estudos que envolvam *P. intermedia* e *P. nigrescens* (Amano, 2010; Leung et al., 1996; Lo et al., 2010; Simionato et al., 2006; Yamanaka et al., 2011). Sendo assim, estudos adicionais são desejáveis para caracterizar melhor a modulação do biofilme das espécies de *Prevotella* e investigar suas associações com *P. gingivalis*. A investigação do proteoma destas espécies quando associadas em biofilme, talvez possa caracterizar melhor o comportamento encontrado (Kuboniwa et al., 2012).

4.3 Quantificação por PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR)

Devido à variabilidade encontrada nos ensaios de quantificação dos biofilmes, houve o interesse de investigar a proporção de cada cepa bacteriana no biofilme heterotípico. Portanto, para medir a quantidade relativa de cada microrganismo no biofilme heterotípico, foram realizados ensaios de q-PCR que permitiram analisar a proporção de cada cepa e identificar qual delas estava sendo beneficiada na interação estabelecida.

Neste estudo, foram desenhados iniciadores cepa específicos que permitiram uma quantificação acurada de cada componente da associação, uma vez que permitiram a amplificação de genes de cópia única em cada bactéria. Para a normalização da reação, foi empregado o gene *thiC* presente nas três espécies igualmente em cópia única, ao contrário do gene 16SrRNA, comumente utilizado como normalizador na literatura. Segundo Maeda et al. (2003), o número de cópias do gene 16SrRNA difere entre as espécies, o que poderia ocasionar um cálculo superestimado ou subestimado das contagens realizadas. Com a

publicação do sequenciamento do genoma destas espécies, o número de cópias do gene 16SrRNA foi determinado como quatro cópias em *P. gingivalis* e cinco em *P. intermedia*. Assim, optamos por utilizar o gene *thiC* que seria mais adequado para servir de normalizador da reação de q-PCR.

Além dos ensaios realizados entre as cepas padrão, foram selecionados para análise por q-PCR, quatro isolados clínicos de *P. intermedia* 06, 09, 10 e 11 e suas associações com cepas padrão de *P. gingivalis* W83 e ATCC 33277. Estas cepas foram escolhidas com base na variabilidade dos resultados de biomassa que foram determinados entre as associações estabelecidas.

Os resultados de q-PCR de cepas de *P. intermedia* com as cepas *P. gingivalis* W83 e ATCC 33277 estão apresentados na Figura 7.

Figura 7- Quantificação por q-PCR da associação entre cepas padrão de *Prevotella intermedia* e de quatro isolados clínicos de *Prevotella intermedia* (06, 09, 10 e 11) com cepas de *Porphyromonas gingivalis* (W83 e ATCC 33277), no biofilme heterotípico.

A Figura 7 demonstra que apesar de inicialmente as espécies terem sido associadas em idênticas proporções para os ensaios de formação de biofilme (50% de cada patógeno associado) este perfil não se manteve. No biofilme heterotípico ocorreu uma mudança de proporcionalidade entre as cepas associadas no consórcio. Observa-se uma variabilidade na participação de cada espécie no biofilme, ora prevalecendo uma em detrimento do crescimento do outro patógeno associado.

Exceto pela associação de *P. intermedia* 17 com *P. gingivalis* W83, observa-se uma tendência de comportamento entre as cepas. Em todas as associações realizadas entre cepas de *P. intermedia* com cepas de *P. gingivalis* esta última foi mais prevalente no biofilme heterotípico, mantendo-se acima de 80% da biomassa. Assim, houve um favorecimento desta espécie nestes consórcios microbianos.

Entretanto, nas associações entre *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* W83, verificamos que *P. intermedia* 17 constituiu 84% do biofilme formado após 24 h de interação enquanto *P. gingivalis* W83 constituiu um total de 16%. A análise dos dados obtidos por q-PCR instigou-nos a uma investigação mais aprofundada do fenômeno que estava ocorrendo. Portanto, fizemos uma correlação com os dados obtidos da quantificação de biomassa (item 4.2) no intuito de confirmar possíveis relações positivas e/ou negativas para espécies envolvidas. No biofilme heterotípico de *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* W83 uma biomassa de $0,538 \pm 0,04$ foi calculada. Segundo os cálculos de q-PCR, *P. gingivalis* W83 constitui 16% deste biofilme, o que equivale a uma biomassa de 0,086. Para o seu monobiofilme uma biomassa de $0,066 \pm 0,01$ foi determinada. Assim, esta diferença de 0,020 representa aproximadamente 30% de aumento de *P. gingivalis* no consórcio. O mesmo cálculo aplicado para *P. intermedia* 17, que constituiu 84% do biofilme heterotípico por q-PCR equivale a um valor de 0,452. Comparando-se este valor (0,452) com o de monobiofilme de *P. intermedia* 17 ($0,218 \pm 0,07$) houve um aumento de mais de 100% em relação ao seu monobiofilme. Assim, podemos concluir que nesta associação *P. intermedia* 17 foi a espécie mais beneficiada do consórcio embora *P. gingivalis* também tenha sido beneficiada.

Os resultados de q-PCR das associações entre a cepa padrão de *P. nigrescens* com cepas de *P. intermedia* estão apresentados na Figura 8.

Figura 8- Quantificação de *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 com cepas de *Prevotella intermedia* 17, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 e isolados clínicos, no biofilme heterotípico através de q-PCR.

Com a análise destes resultados concluímos que conforme no ensaio anterior, as espécies foram associadas na proporção de 50% de cada microrganismo e após 24 h de formação do biofilme a proporção de cada patógeno mudou de acordo com a associação estabelecida.

Nas interações realizadas entre a cepa de *P. nigrescens* com cepas de *P. intermedia* houve uma variabilidade de acordo com o consórcio estabelecido. Na associação de *P. nigrescens* ATCC 33563 com *P. intermedia* 17, esta última constitui 56% do biofilme, mostrando um equilíbrio em termos de proporcionalidade entre os patógenos associados. Na associação com *P. intermedia* ATCC 25611, 67% da biomassa é composto pela cepa *P. nigrescens* ATCC 33563, demonstrando um predomínio desta cepa. Nos consórcios com os isolados clínicos de *P. intermedia*, *P. nigrescens* constituiu 93% da biomassa na associação com o isolado 11; 54% com o isolado 09 e na interação com o isolado 06, este foi predominante (66%) no biofilme misto.

Foram realizados ensaios de q-PCR para as associações de cepas de *P. nigrescens* com as cepas padrão de *P. gingivalis*. Estes resultados estão apresentados na Figura 9.

Figura 9- Quantificação de *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 e do isolado *Prevotella nigrescens* 37 com cepas padrão de *Porphyromonas gingivalis* no biofilme heterotípico através de q-PCR.

Podemos observar que nestas associações de cepas de *P. nigrescens* com cepas de *P. gingivalis*, esta última foi mais prevalente no biofilme heterotípico com uma média de 74% da biomassa em todas as associações. Estes dados sugerem que *P. gingivalis* é favorecida nos consórcios com *P. nigrescens*.

Nossos resultados demonstraram que a investigação da proporcionalidade dos microrganismos ao se estabelecerem em comunidades bacterianas varia de acordo com as cepas associadas nos biofilmes, e a variabilidade intraespecífica encontrada no presente estudo sugere que pode haver interferência na capacidade de *P. intermedia*, *P. nigrescens* e de *P. gingivalis* de reconhecimento de moléculas de superfície nas associações entre estas cepas, modulando a formação do biofilme não apenas em termos quantitativos como também qualitativos. Esta modulação pode levar a uma variação no potencial patogênico das espécies bacterianas encontradas na bolsa periodontal.

Este trabalho demonstrou a importância da quantificação de cada espécie associada em biofilme para um melhor entendimento das relações interespecíficas de modo que a variabilidade intraespecífica seja considerada em futuros estudos de biofilme.

4.4 Avaliação da formação de biofilmes monotípicos e heterotípicos em sistema de dois compartimentos

As espécies que compõe o biofilme podem interferir na sua formação, pela difusão de produtos e subprodutos metabólicos solúveis liberados no meio, que independentes do contato

célula a célula, podem modular o biofilme, alterando o comportamento e a composição das espécies nele associadas (Saito et al., 2008).

A fim de complementar os ensaios de formação de biofilme e investigar como estas associações se comportam quando os patógenos estudados são cocultivados, foi utilizado o sistema de cultivo em dois compartimentos, segundo Okuda et al., 2012 *b*.

Os resultados dos ensaios de *P. intermedia* 17 com cepas padrão de *P. gingivalis* e com *P. nigrescens* ATCC 33563 no biofilme heterotípico em sistema compartimentalizado estão apresentados na Figura 10.

Figura 10- Quantificação da biomassa formada por co-cultivo entre *Prevotella intermedia* 17 com cepas de *Porphyromonas gingivalis* W83, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 e *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 no biofilme heterotípico, em sistema de dois compartimentos.

As cepas foram co-cultivadas, separadas por um inserto membranso de 0,4 µm de diâmetro.

#: amostra cultivada no compartimento superior

* comparação entre o biofilme do heterotípico e o monotípico da primeira cepa, com diferença estatística significante, com valor de $p < 0,05$.

Neste ensaio de co-cultivo, houve um aumento da biomassa de *P. intermedia* 17 quando associada com ambas as cepas *P. gingivalis*, podendo-se destacar que na associação com *P. gingivalis* W83 houve um aumento mais acentuado da biomassa de *P. intermedia* 17. Assim, podemos considerar que *P. gingivalis* secreta algum fator no meio que influencia positivamente o biofilme de *P. intermedia* 17, sem a necessidade de contato entre as espécies. De forma semelhante, mesmo quando houve contato físico destas nos experimentos de quantificação de biofilme (item 4.2), um aumento da biomassa foi também observado para os consórcios de *P. intermedia* 17 com ambas as cepas de *P. gingivalis*. Porém, os ensaios de q-PCR (item 4.3) mostraram que as proporções de cada cepa foram diferentes e cepa dependentes.

Neste mesmo ensaio, houve um aumento da biomassa de *P. gingivalis* ATCC 33277 quando associada com *P. intermedia* 17, porém o mesmo não ocorreu para a cepa *P. gingivalis* W83, demonstrando que fatores solúveis de *P. intermedia* 17 influenciam seletivamente as cepas de *P. gingivalis*.

Quando o co-cultivo foi de *P. intermedia* 17 e *P. nigrescens* ATCC 33563 não houve diferença significativa para ambas as cepas associadas.

Os ensaios de *P. intermedia* ATCC 25611 com cepas de *P. gingivalis* e com *P. nigrescens* ATCC 33563 em sistema de dois compartimentos estão representados na Figura 11.

Figura 11- Quantificação da biomassa formada por co-cultivo em sistema de dois compartimentos entre *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Porphyromonas gingivalis* W83, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 e *Prevotella nigrescens* ATCC 33563.

As cepas foram co-cultivadas, separadas por um inserto membranoso de 0,4 µm de diâmetro.

#: amostra cultivada no compartimento superior

* comparação entre o biofilme do heterotípico e o monotípico da primeira cepa, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

Quando cocultivamos *P. intermedia* ATCC 25611 com cepas padrão de *P. gingivalis* W83 e ATCC 33277 obtivemos resultados semelhantes aos ensaios realizados para *P. intermedia* 17. O mesmo também foi observado na associação com *P. nigrescens* ATCC 33563.

As duas cepas de *P. intermedia* beneficiaram-se tanto com a presença de *P. gingivalis* W83 quanto com a presença de *P. gingivalis* ATCC 33277 no compartimento superior, enquanto que somente *P. gingivalis* ATCC 33277 foi beneficiada pela presença das duas cepas de *P. intermedia*. Portanto, podemos concluir que a modulação e constituição do biofilme de *P. intermedia* e *P. gingivalis* são cepa/contato dependentes.

Na associação de *P. nigrescens* ATCC 33563 com *P. intermedia* 17 e ATCC 25611, estas não sofreram influência significativa em seus respectivos biofilmes. Porém, nos ensaios de quantificação do biofilme (item 4.2), houve influência significativa nos valores da biomassa em ambos os casos. Influência na composição também foi demonstrada nos ensaios de q-PCR (item 4.3). Assim, nossos resultados demonstram que não há interferência na modulação do

biofilme sem contato entre as espécies, mas a biomassa e composição são alteradas quando ocorre ligação entre essas espécies, e aparentemente a modulação é cepa dependente.

Já foi demonstrado na literatura que as espécies *P. intermedia* e *P. nigrescens* podem influenciar o biofilme de outras espécies orais. Okuda e colaboradores (2012b) estudando a influência de cepas de *P. intermedia* e *P. nigrescens* em biofilmes de *Fusobacterium nucleatum* em sistema de dois compartimentos demonstraram um aumento na biomassa de *F. nucleatum* quando cocultivados com estas espécies.

A literatura também é diversa quanto a estudos com outras espécies orais e o papel desta na modulação de biofilmes. Standar e colaboradores (2010) realizaram ensaios de formação de biofilme entre as espécies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus mitis* por co-cultivo em sistema de dois compartimentos e foi demonstrado que as contagens de *A. actinomycetemcomitans* foram reduzidas a zero quando *S. mitis* estava presente no compartimento superior. Okuda e colaboradores (2012a) demonstraram o sinergismo na formação de biofilme entre *F. nucleatum* e *Capnocytophaga ochracea* através do sistema de cocultura em dois compartimentos. Seus achados indicam que a indução da coagregação e de interações celulares por fatores difusíveis de *C. ochracea* através da membrana tiveram um importante papel na modulação do biofilme.

Moléculas de sinalização celular que modulariam a formação do biofilme oral já estão sendo investigadas através de ensaios de co-cultivo em sistema de dois compartimentos e tem sido demonstrado ser uma ferramenta útil na avaliação das interações entre as diferentes espécies no biofilme (Yoshida et al., 2005b). Sendo assim, estudos posteriores são necessários para identificar fatores que seriam liberados pelos microrganismos e que poderiam interferir na formação do biofilme.

4.5 Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH) e Microscopia confocal

Os arranjos estruturais formados entre os microrganismos quando cultivados em biofilmes heterotípicos são frequentemente observados através de ensaios de microscopia confocal a laser, metodologia amplamente descrita na literatura (Capestany et al., 2008; Davey, Costerton, 2006; Davey, O'Toole, 2000; Moter et al., 1998; Sunde et al., 2003; Standar et al., 2010; Schillinger et al., 2012).

Os dados capturados nas imagens foram analisados por Software Zeiss LSM Image Browser e ilustraram o comportamento das espécies quando associadas no biofilme

heterotípico e monotípico. A análise por microscopia confocal possibilita também a realização de cortes seccionais no biofilme formado, permitindo a medição da espessura da biomassa e a inspeção visual dessas associações.

Para isso, foram realizadas marcações das espécies bacterianas com sondas específicas ligadas a corantes fluorocromos, pela técnica de FISH.

As imagens da microscopia entre as associações de *P. intermedia* 17 e cepas de *P. gingivalis* e seus respectivos monobiofilmes estão apresentadas na Figura 12.

Figura 12- Microscopia confocal a laser de biofilmes monotípicos e heterotípicos de *Prevotella intermedia* 17 (sonda PRIN) com *Porphyromonas gingivalis* W83 e *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (sonda POGI).

As imagens da microscopia entre as associações de *P. intermedia* ATCC 25611 e cepas de *P. gingivalis* e seus respectivos monobiofilmes estão apresentadas na Figura 13.

Figura 13 - Microscopia confocal a laser de biofilmes monotípicos e heterotípicos de *Prevotella intermedia* ATCC 25611 (sonda PRIN) com *Porphyromonas gingivalis* W83 e *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (sonda POGI).

Fig. A: Biofilme de *P. intermedia* ATCC 25611

Fig. B: Biofilme de *P. gingivalis* W83

Fig. C: Biofilme de *P. gingivalis* ATCC 33277

Fig. D: Biofilme Heterotípico de *P. intermedia* ATCC 25611 x *P. gingivalis* W83

Fig. E: Biofilme Heterotípico de *P. intermedia* ATCC 25611 x *P. gingivalis* ATCC 33277

Cortes ortogonais (aumento, X100. LSM, ZEISS LSM IMAGE BROWSER, versão 3.5.0.223).

A Tabela 2 apresenta os resultados da espessura média dos biofilmes das cepas padrão de *P. intermedia* e de *P. gingivalis* obtidos através de ensaios de microscopia confocal.

Tabela 2– Espessura de biofilmes (μm) de cepas padrão de *Prevotella intermedia* e *Prevotella gingivalis* monotípicos e heterotípicos obtidas através de ensaios de microscopia confocal.

Cepas	Média $\pm$ dp (n=3)*
<i>P. intermedia</i> 17	12,2 $\pm$ 0,4
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	16,5 $\pm$ 0,2
<i>P. gingivalis</i> W83	2,45 $\pm$ 0,2
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	4,0 $\pm$ 1,7
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. gingivalis</i> W83	17,84 $\pm$ 0,3
<i>P. intermedia</i> 17 x <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	4,54 $\pm$ 0,3
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611 x <i>P. gingivalis</i> W83	3,23 $\pm$ 0,5
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611 x <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	5,5 $\pm$ 0,1

* Média das espessuras dos biofilmes

A observação dos biofilmes através dos cortes ortogonais realizados nas imagens permite avaliar a diferença da espessura entre os monobiofilmes, bem como entre os heterobiofilmes de *P. intermedia* com *P. gingivalis*.

A Figura 12 permite visualizar os biofilmes heterotípicos e os monobiofilmes e observar os arranjos tridimensionais formados pelas cepas de *P. intermedia* 17 e de *P. gingivalis* W83 e ATCC 33277. No biofilme de *P. gingivalis* W83 um arranjo mais esparso e uma camada delgada foram observados. No biofilme de *P. gingivalis* ATCC 33277 um arranjo semelhante ao biofilme de *P. intermedia* 17 foi verificado, formando um tapete de células mais homogêneo, embora mais delgado. Na Tabela 2, os valores de espessura mostraram que o biofilme de *P. intermedia* 17 tem monocamada mais espessa apresentando uma relativa uniformidade quando comparadas aos biofilmes das cepas de *P. gingivalis*.

Na Figura 12, e conforme os valores obtidos na Tabela 2, foi também observado que a associação *P. intermedia* 17 com *P. gingivalis* W83 formou um biofilme mais volumoso com características de homogeneidade. Na associação de *P. intermedia* 17 com *P. gingivalis* ATCC 33277 um biofilme mais delgado que a associação anterior foi observado, e o arranjo tridimensional ocorreu em forma de grumos de células bacterianas.

Na Figura 13 podemos visualizar os biofilmes heterotípicos e os monotípicos e analisar os arranjos tridimensionais formados por eles. A cepa *P. intermedia* ATCC 25611 tem monocamada uniforme e espessa em relação às cepas de *P. gingivalis*, conforme os valores da Tabela 2. Os cortes ortogonais realizados permitem afirmar que as associações de *P. intermedia* ATCC 25611 com cepas de *P. gingivalis* formaram uma biomassa delgada em

relação a *P. intermedia* ATCC 25611, porém mais espessos do que os biofilmes de ambas cepas de *P. gingivalis*.

Os resultados das medidas das espessuras dos monobiofilmes de cada cepa mostraram uma relação direta com a quantificação da biomassa (item 4.2) dos monobiofilmes – *P. intermedia* ATCC 25611 > *P. intermedia* 17 > *P. gingivalis* ATCC 33277 > *P. gingivalis* W83. Uma relação semelhante pode ser determinada para os heterobiofilmes, sendo que a associação *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* W83 apresentou o biofilme de maior espessura seguidos pelos consórcios *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* ATCC 33277; *P. intermedia* ATCC 25611 e *P. gingivalis* ATCC 33277 e *P. intermedia* ATCC 25611 e *P. gingivalis* W83. De modo geral, estes resultados demonstram que a modulação do biofilme heterotípico de *P. intermedia* e *P. gingivalis* é cepa dependente.

Em estudos realizados com outras espécies da cavidade oral, a estrutura tridimensional dos biofilmes orais são comumente avaliados através de ensaios FISH e microscopia confocal (Dige et al., 2007; Marsh et al., 2011; Schlafer et al., 2011; Zijnga et al., 2010) e apresentam belíssimas imagens dos arranjos microbianos estabelecidos entre as variadas espécies que compõe o biofilme oral. Nos ensaios de Yamada et al. (2005), foi analisado o biofilme heterotípico de *P. gingivalis* e *T. denticola* e foi demonstrado que inicialmente *P. gingivalis* se liga ao substrato e em seguida *T. denticola* coadere para formar o biofilme misto. Estes autores relatam que ocorre um sinergismo entre estas espécies na formação do biofilme. Davey e Costerton (2006) em trabalho de revisão da literatura, afirmaram que estudos que utilizaram microscopia confocal demonstraram que a arquitetura da placa subgengival é heterogênea, consistindo em áreas com alta densidade celular, envolvida por uma matriz extracelular e onde também se encontram áreas abertas, dentro desta comunidade bacteriana.

A visualização *in vivo* de biofilme subgengival mostra que *P. gingivalis* e *P. intermedia* crescem em microcolônias distintas, sugerindo que não ocorre co-agregação entre essas espécies (Zijnga et al., 2010). Schillinger et al (2012) verificaram uma distribuição aleatória de *P. gingivalis* e *P. intermedia* em biofilmes desenvolvidos na região subgengival. Os autores consideram que o arranjo espacial de distribuição dessas espécies sugere que a coexistência entre *P. gingivalis* e *P. intermedia* no mesmo biofilme é causada por fatores ainda não esclarecidos (Schillinger et al., 2012). Os poucos relatos de relações ecológicas entre *P. intermedia* e *P. gingivalis* apresentam ainda resultados controversos, evidenciando que essas relações precisam ser melhor estudadas.

4.6 Ensaios realizados com as linhagens mutantes *P. intermedia* 17ΔPINA0102 e *P. intermedia* 17ΔPIN0398

A fim de verificar se os genes PINA0102 e PIN0398, que codificam adesinas bacterianas, teriam um importante papel na formação do biofilme, linhagens mutantes foram criadas na cepa *P. intermedia* 17 e foram avaliadas suas associações com cepas de *P. gingivalis* W83 e ATCC 33277, bem como com *P. nigrescens* ATCC 33563. Múltiplos ensaios foram realizados, sendo eles quantificação de biomassa, ensaios de q-PCR e também ensaios de quantificação em sistema de co-cultivo, sem contato entre as espécies. Os ensaios realizados com as linhagens mutantes foram desenvolvidos seguindo os mesmos protocolos descritos na metodologia deste estudo e todos foram pareados com os da cepa selvagem *P. intermedia* 17.

4.6.1 Quantificação da biomassa

Os resultados da quantificação da biomassa formada entre as linhagens mutantes *P. intermedia* 17ΔPINA0102 e *P. intermedia* 17ΔPIN0398 com cepas padrão de *P. gingivalis* e de *P. nigrescens* estão apresentados na Figura 14.

Figura 14- Quantificação (DO_{490nm}) da biomassa formada entre as linhagens mutantes *Prevotella intermedia* 17ΔPINA0102 e *Prevotella intermedia* 17ΔPIN0398 com cepas de *Porphyromonas gingivalis* e de *Prevotella nigrescens*.

* comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico dos isolados clínicos, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$

+ comparação entre o biofilme heterotípico e o monotípico das cepas padrão, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$.

α: comparação entre a linhagem mutante e a cepa selvagem, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$

A análise desta figura permitiu-nos observar que a linhagem Pi17ΔPIN0398 desenvolveu menor biomassa do que a cepa parental *P. intermedia* 17 mostrando que a deleção do gene PIN0398 reduziu a capacidade de *P. intermedia* 17 de formar monobiofilme. Bem como, em todos os ensaios de heterobiofilmes a deleção deste gene alterou negativamente a biomassa dos consórcios com ambas as cepas de *P. gingivalis* e *P. nigrescens* ATCC 33563. Assim, estes dados demonstram a importância do gene PIN0398 na formação de biofilme por *P. intermedia* 17.

A deleção do gene PINA0102 também reduziu a formação de monobiofilme em comparação à cepa parental. O mesmo ocorreu na associação com a cepa *P. gingivalis* ATCC 33277. Porém, com *P. gingivalis* W83 e *P. nigrescens* ATCC 33563 a deleção deste gene não alterou significativamente a biomassa formada. Assim, estes resultados demonstram que a adesina codificada por este gene tem sua importância na formação de biofilme de *P. intermedia* 17, possivelmente com especificidade variada para cepas de *P. gingivalis*.

4.6.2 Quantificação por PCR quantitativo em Tempo Real (q-PCR)

Os resultados da proporção de *P. intermedia* 17, Pi17ΔPINA0102 e Pi17ΔPIN0398 com cepas de *P. gingivalis* e de *P. nigrescens*, através de q-PCR estão apresentados na Figura 15.

Figura 15- Quantificação por q-PCR da associação entre *Prevotella intermedia* 17, *Prevotella intermedia* 17Δ0102 ou *Prevotella intermedia* 17Δ0398 com cepas de *Porphyromonas gingivalis* W83, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 e com *Prevotella nigrescens* ATCC 33563 no biofilme heterotípico.

Na Figura 15 podemos constatar que a deleção do gene PIN0398 alterou a proporção de *P. intermedia* com a cepa *P. gingivalis* W83, ao contrário da linhagem mutante Pi17ΔPINA0102. Estes resultados podem ser relacionados com as alterações observadas na quantificação da biomassa deste mutante no consórcio com *P. gingivalis* W83, onde houve uma redução da biomassa em relação à cepa parental.

Nas associações com *P. gingivalis* ATCC 33277 ambos os genes afetaram a proporção de *P. intermedia* neste consórcio. Estes dados são congruentes com a redução observada das biomassas destas linhagens associadas com *P. gingivalis* ATCC.

Nas associações com *P. nigrescens*, a deleção do gene PIN0398 reduziu a proporção de *P. intermedia* no consórcio, embora a deleção do gene PINA0102 pouco afetou a proporção *P. intermedia*. Estes resultados são compatíveis com os dados obtidos na quantificação da biomassa destas associações, onde também houve uma redução no consórcio Pi17ΔPIN0398 com *P. nigrescens*.

4.6.3 Co-cultura em sistema de dois compartimentos

Para complementar a importância dos genes PINA0102 e PIN0398 na formação do biofilme foram também realizados os ensaios de co-cultivo em dois compartimentos. Os resultados da quantificação da biomassa formada entre a linhagem mutante *Pi17ΔPINA0102* com cepas padrão de *P. gingivalis* e de *P. nigrescens* estão apresentados na Figura 16.

Figura 16- Quantificação (DO_{490nm}) da biomassa formada entre as linhagens mutantes *Prevotella intermedia* 17ΔPINA0102 com cepas padrão de *Porphyromonas gingivalis* e de *Prevotella nigrescens* cultivadas em sistema de dois compartimentos.

As cepas foram co-cultivadas, separadas por um inserto membranoso de 0,4 μm de diâmetro; #: amostra cultivada no compartimento superior

*: comparação entre a linhagem mutante e a cepa selvagem, com diferença estatística significativa, com valor de $p < 0,05$

Do ensaio acima descrito na forma gráfica, temos que o mutante *Pi17ΔPINA0102* quando associado com *P. gingivalis* W83 e com *P. nigrescens* ATCC 33563 comportou-se de maneira semelhante à cepa selvagem. O sistema de cultivo não alterou a biomassa formada, à exceção do co-cultivo com a cepa *P. gingivalis* ATCC 33277 quando esta se encontrava no compartimento superior. Novamente a deleção deste gene provou ser importante no co-cultivo com a cepa *P. gingivalis* ATCC.

Os resultados da quantificação da biomassa formada entre a linhagem mutante Pi17ΔPIN0398 com cepas padrão de *P. gingivalis* e de *P. nigrescens* cultivadas no sistema de dois compartimentos estão apresentados na Figura 17.

Figura 17- Quantificação (DO_{490nm}) da biomassa formada entre as linhagens mutantes *P. intermedia* 17ΔPIN0398 com cepas padrão de *Porphyromonas gingivalis* e de *Prevotella nigrescens* cultivadas em sistema de dois compartimentos.

As cepas foram co-cultivadas, separadas por um inserto membranosos de 0,4 μm de diâmetro.; #: amostra cultivada no compartimento superior

*: comparação entre a linhagem mutante e a cepa selvagem, com diferença estatística significante, com valor de $p < 0,05$

Na Figura 17 o mutante Pi17ΔPIN0398 quando associado com *P. gingivalis* W83 teve sua biomassa reduzida em relação à cepa selvagem, sendo que com as demais cepas não houve alteração. Igualmente a deleção deste gene provou ser importante no co-cultivo com a cepa *P. gingivalis* W83.

A deleção destes genes que codificam proteínas de superfície de *P. intermedia* pode ter resultado em alterações da distribuição espacial de proteínas da membrana externa, que possam justificar a modulação encontrada, alterações estas que aparentemente podem ser cepa/espécie específicas. Estudos adicionais irão esclarecer melhor o papel destes genes nas interações investigadas na medida em que os fatores solúveis sejam revelados.

5 Conclusões

Os resultados deste estudo permitem questionamentos sobre o agravamento da patogenicidade “*in vivo*”, que poderia ocorrer devido às interações cepa-específica estabelecidas entre alguns microrganismos anaeróbios associados à doença periodontal, merecendo a continuidade deste estudo.

Após as análises dos dados obtidos neste estudo chegamos as seguintes conclusões:

- A capacidade de coagregação entre *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* é variável e comportou-se de maneira cepa dependente.
- A quantificação da biomassa dos vários consórcios estudados demonstrou uma alta variabilidade na capacidade de formação de biofilmes heterotípicos tanto quanto de monotípicos.
- Nos ensaios de q-PCR, *P. gingivalis* foi favorecida na maioria das associações com *P. intermedia* e *P. nigrescens*, exceto no consórcio *P. intermedia* 17 e *P. gingivalis* W83. Porém, nas associações de *P. intermedia* com *P. nigrescens*, um comportamento variado foi observado.
- No sistema de co-cultivo em dois compartimentos houve modulação positiva do biofilme de *P. intermedia* por *P. gingivalis* e nenhuma alteração foi detectada nas associações de *P. intermedia* e *P. nigrescens*.
- Os resultados da microscopia confocal mostraram que as medidas das espessuras dos biofilmes monotípicos de cada cepa tiveram uma relação direta com a quantificação da biomassa dos mesmos e uma relação semelhante para os biofilmes heterotípicos. De modo geral, estes resultados demonstram que a modulação do biofilme heterotípico de *P. intermedia* e *P. gingivalis* é cepa dependente.
- A deleção do gene PIN0398 reduziu a formação de biofilmes mono e heterotípicos. Também alterou a proporção de *P. intermedia* nos consórcios com *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. E nos ensaios de co-cultivo em dois compartimentos, a deleção deste gene alterou a biomassa quando influenciado por *P. gingivalis* W83.
- A deleção do gene PINA0102 reduziu a biomassa do biofilme monotípico. Em relação aos biofilmes heterotípicos com *P. gingivalis* ATCC 33277, houve uma redução da biomassa, uma alteração na composição deste biofilme e uma redução na biomassa sob influência desta cepa de *P. gingivalis*.

Como conclusão geral, podemos inferir que a variabilidade intra-específica interfere na capacidade de *P. intermedia* e de *P. nigrescens* de interagir com *P. gingivalis*, modulando a formação do biofilme, não apenas em termos quantitativos mas também de forma qualitativa.

REFERÊNCIAS*

- Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodont Res*. 2010;45:389-95.
- Al-Radha ASD, Pal A, Pettemerides AP, Jenkinson HF. Molecular analysis of microbiota associated with peri-implant diseases. *J Dentistry*. 2012;40:989-98.
- Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. *J Dent Res*. 2000;79(9):1664-8.
- Amano A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*. 2003;74(1):90-6.
- Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res*. 2004;39(2):136-42.
- Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontology* 2000. 2010;52:12-37.
- American Academy of Periodontology. Parameters of care. *J Periodontol*. 2000;71:847-83.
- Anyanful A, Dolan-Livengood JM, Lewis T, Sheth S, DeZalia MN, Sherman MA, Kalman LV, Benian GM, Kalman D. Paralysis and killing of *Caenorhabditis elegans* by enteropathogenic *Escherichia coli* requires the bacterial tryptophanase gene. *Molecular Microbiol*. 2005;57(4):988-1007.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal disease and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4:1-6.
- Ashimoto A; Chen C; Bakker I; Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1996;11:266-73.
- Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of blackpigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod*. 1999;25(6):413-15.
- Beem JE, Nesbitt WE, Leung K-P. Cloning of *Prevotella intermedia* loci demonstrating multiple hemolytic domains. *Oral Microbiol Immunol*. 1999;14:143-52.
- Biyikoglu B, Ricker A, Diaz PI. Strain-specific colonization patterns and serum modulation of multi-species oral biofilm development. *Anaerobe*. 2012; 18: 459-70.

* De acordo com:

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

Brook I. Microbiology of intracranial abscesses associated with sinusitis of odontogenic origin. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115(12):917-20.

Buduneli N, Baylas H, Buduneli E, Türkoglu O, Köse T, Dahlen G. Periodontal infections and preterm low birth weight: a casecontrol study. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 174-81.

Bulkacz J, Faull KF. Multiple extracellular phospholipase activities from *Prevotella intermedia*. *Anaerobe*. 2009 Jun;15(3):91-4.

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

Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, Mira A. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50(11):3562-68.

Capestany CA, Tribble GD, Maeda K, Demuth DR, Lamont RJ. Role of the clp system in stress tolerance, biofilm formation, and intracellular invasion in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*. 2008 Feb;1436-46.

Chen X, Ansai T, Awano S, Iida T, Barik S, Takehara T. Isolation, cloning, and expression of an acid phosphatase containing phosphotyrosyl phosphatase activity from *Prevotella intermedia*. *J Bacteriol*. 1999; 181(22):7107-14.

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

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

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.

Cugini C, Klepac-Ceraj V, Rackaityte E, Riggs JE, Davey ME. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *J Oral Microbiol*. 2013;5.

Davey ME, O'Toole G A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(4):847-67.

Davey M, Costerton JW. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontology* 2000. 2006; 42: 13-26.

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

Dibart S, Skobe Z, Snapp KR, Socransky SS, Smith CM, Kent R. Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol*. 1998;13:30-5.

Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B. In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci*. 2007;115(6):459-67.

Dolgilevich S, Rafferty B, Luchinskaya D, Kozarov E. Genomic comparison of invasive and rare non-invasive strains reveals *Porphyromonas gingivalis* genetic polymorphisms. *J. Oral Microbiol*. 2011; 3: 5764.

Dorn BR, Leung KP, Progulske-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect. Immun*. 1998;66(12):6054-57.

Dorn BR, Dunn Jr. WA, Progulske-Fox A. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect. Immun*. 1999;67(11):5792-98.

Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun*. 1993;61:2260-65.

Eley BM, Cox SW. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:105-24.

Falkler WA Jr, Enwonwu CO, Idigbe EO: Microbiological understandings and mysteries of noma (cancrum oris). *Oral Dis*. 1999;5(2):150-55.

Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J. Periodontol*. 2005;76:731-6.

Ford PJ, Gemmell E, Chan A, Carter CL, Walker PJ, Bird PS, M. J. West, M. P. Cullinan, and G. J. Seymour. Inflammation, heat shock proteins and periodontal pathogens in atherosclerosis: an immunohistologic study. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21:206-11.

Frandsen EVG, Poulsen K, Curtis MA, Kilian M. Evidence of recombination in *Porphyromonas gingivalis* and random distribution of putative virulence markers. *Infect Immun*. 2001;69(7):4479-85.

Fukushima H, Yamamoto K, Hirohata K, Sagawa H, Leung K-P, Walker C: Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J Endod*. 1990;16(11):534-8.

Fukushima H, Moroi H, Inoue J, Onoe T, Ezaki T, Yabuuchi E, Leung K-P, Walker CB, Clark WB, Sagawa H. Phenotypic characteristics and DNA relatedness in *Prevotella intermedia* and similar organisms. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:60-4.

Gazi M I, S. W. Cox, D. T. Clark, and B. M. Eley. Characterization of protease activities in *Capnocytophaga* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp., *Treponema denticola* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*. 1997;12:240-8.

Gazi MI, S. W. Cox, D. T. Clark, and B. M. Eley. Comparison of host tissue and bacterial dipeptidyl peptidases in human gingival crevicular fluid by analytical isoelectric focusing. *Arch Oral Biol*.1995;40:731-6.

Gharbia SE, Haapasalo M, Shah H, Kotiranta A, Lounatmaa K, Pearce MA, Devine DA. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol*. 1994;65:56-1.

Gmur R, Thurnheer T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. *Microbiol*. 2002;148:1379-87.

Gomes B., Jacinto R., Pinheiro E., Sousa E., Zaia A., Ferraz C., Souza-Filho F. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20: 211–15.

Guan SM, Nagata H, Shizukuishi S, Wu JZ. Degradation of human hemoglobin by *Prevotella intermedia*. *Anaerobe*. 2006; 12: 279-82.

Guillot E. And Mouton C. PCR-DNA Probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. *J. Clin. Microbiol*. 1997; p. 1876-82.

Gursoy U. K., Kononen E., Uitto V. J. *Prevotella intermedia* ATCC 25611 targets host cell lamellipodia in epithelial cell adhesion and invasion. *Oral Microbiology Immunology*. 2009; 24: 304–09.

Hamada S, Amano A, Kimura S, Nakagawa I, Kawabata S, Morisaki I. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 1998; 13: 129-38.

Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J. Periodontol*. 2000; 71: 1554-60.

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

Hyvärinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, Kononen E, Pussinen PJ. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immunity*. 2009; 15(4):195–04.

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

Iyer D, Anaya-Bergman C, Jones K, Yanamandra S, Sengupta D, Miyazaki H, et al. AdpC is a *Prevotella intermedia* 17 leucine-rich repeat internalin-like protein. *Infect Immun*. 2010;78(6):2385-96.

- Jansen HJ, Grenier D, Hoeven JS Van der: Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol*. 1995; 10(3):138-45.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005;13(12):589-95.
- Kamaguchi A, Nakayama K, Ohyama T, Watanabe T, Okamoto M, Baba H. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Microbiol Immunol*. 2001;45, 649–56.
- Kamaguchi A, Ohyama T, Sakai E, Nakamura R, Watanabe T, Baba H, Nakayama K. Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. *Microbiol*. 2003; 149: 1257–64.
- Kolenbrander PE. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annu Rev Microbiol*. 1988;42:627-56.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66(3):486-505.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000. 2006;42:47-79.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(7):471-80.
- Könönen E, Wolf J, Mättö J, Frandsen EVG, Poulsen K, Jousimies-Somer H, Asikainen S. The *Prevotella intermedia* group organisms in young children and their mothers as related to maternal periodontal status. *J Periodont Res*. 2000;35: 329-34.
- Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulske-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect*. 2006;8:687-93.
- Kinder SA, Holt SC. Coaggregation between bacterial species. *Methods Enzymol*. 1994; 236:254-70.
- Kirschbaum M, Schultze-Mosgau S, Pfister W, Eick S. Mixture of periodontopathogenic bacteria influences interaction with KB cells. *Anaerobe*. 2010;16:461- 8.
- Kuboniwa M, Amano A, Kimura RK, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Lida T, Shizukuishi S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. 2004; 19: 168-76.
- Kuboniwa M, Inaba H, Amano A. Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010;54(1):136-59.
- Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. *Periodontology* 2000. 2010;52: 38–52.

- Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9(3):311-23.
- Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007; 653–70.
- Laine ML, van Winkelhoff AJ. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*. 1998;13(5):322-5.
- Lamont RJ, Oda D, Persson RE, Persson GR. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7: 364–67.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(4):1244-63.
- Lee J, Jayaraman A, Wood TK. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol*. 2007; 7-42.
- Leung KP, Fukushima H, Nesbitt WE, Clark WB. *Prevotella intermedia* fimbriae mediate hemagglutination. *Oral Microbiol Immunol*. 1996;11(1):42-50.
- Leung K-P, Nesbitt W, Okamoto M, Fukushima H: Identification of a fimbriae-associated haemagglutinin from *Prevotella intermedia*. *Microb Pathog*. 1999;26:139-48.
- Levesque C, Lamothe J, Frenette M. Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with periodontopathogens: evidence for involvement of fimbriae in the interaction with *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(5):333-7.
- Lo A , Seers C, Dashper S, Butler C, Walker G, Walsh, K, Catmull D, Hoffmann B, Cleal S, Lissel P, Boyce J. FimR and FimS: biofilm formation and gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol*. 2010;192 (5): 1332–43.
- London J. From dental plaque to oral biofilm: a molecular odyssey. *Microbiol Ecology and Infection Disease*, Edited by Eugene Rosenberg. 1999, American Society for Microbiology, Washington, D.C. Cap. 4 : 53-5.
- López NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in Progressive Adult Periodontitis. *J. Periodontol*. 2000; vol. 71(6): 948-954.
- Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;39(1):81-6.
- Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology* 2000. 2011;55: 16–35.

Matto J, Saarela M, von Troil-Linden B, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Similarity of salivary and subgingival *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 1996;11(6):395-401.

Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr.* 1966;74(5):Suppl:1-380.

Moter A, Leist G, Rudolph R, Shrank K, Choi BK, Wagner M, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology.* 1998;144: 2459-67.

Nadkarni MA, Browne GV, Chhour KL, Byun R, Nguyen KA, Chapple CC, Jacques NA, Hunter N. Pattern of distribution of *Prevotella* species/phylotypes associated with healthy gingiva and periodontal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; Jun. Epub ahead of print]

Neiders ME., Chen PB, Suido H, Reynolds HS, Zambon JJ, Shlossman M. Genco RJ: Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontol Res.* 1989;24(3): 192-8.

Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;178 : 299-304.

Okuda T, Kokubua E, Kawana T, Saito A, Okuda K, Ishihara K. Synergistic effect on biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Capnocytophaga ochracea*. *Anaerobe.* 2012 a; (30)1-5.

Okuda T, Kokubua E, Kawana T, Saito A, Okuda K, Ishihara K. Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella species*. *Anaerobe.* 2012 b; (18) 110-16.

O'Toole GA; Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 1998; 28:449-61.

O'Toole GA. To build a biofilm. *J Bacteriol.* 2003;185(9):2687–9.

Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J Innate Immunol.* 2009;1:70-87.

Raber-Durlacher JE, van Steenberg TJ, Velden U Van der, de Graaff J, Abraham-Inpijn L: Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodontol* 1994;21(8):549-58.

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

Riggio MP, Aga H, Murray CA, Jackson MS, Lennon A, Hammersley N, Bagg J. Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 03: 610-17

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(6):e45.

Robertson D; Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. *Journal of Medical Microbiology.* 2009; 58:155–162.

Rodrigues PH; Barbosa GM; Simionato MRL. Gene PIN0398 is Relevant for Homo- and Heterotypic Biofilms of *Prevotella intermedia*. In: 113th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2013, Denver, CO. 113th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2013.

Saito Y, Fujii R, Nakagawa KI, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K. Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23: 1–6.

Sakamoto M, Suzuki M, Huang Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. *Prevotella shashii* sp. nov. and *Prevotella salivae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54:877-83.

Sasaki-Imamura T, Yoshida Y, Suwabe K, Yoshimura F, Hirohisa Kato. Molecular basis of indole production catalyzed by tryptophanase in the genus *Prevotella*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2011; 322: 51– 59 .

Sato T, Nakazawa F. Coaggregation between *Prevotella oris* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Microbiol, Immunol and Infection.* 2012;20: 1- 5.

Schillinger C, Petrich A, Lux R, Riep B, Kikhney J, Friedmann A, Wolinsky LE, Göbel UB, Daims H, Møller A. Co-localized or randomly distributed? Pair cross correlation of in vivo grown subgingival biofilm bacteria quantified by digital image analysis. *PloS One.* 2012; 7 (5) | e37583.

Schlafer S, Raarup MK, Meyer RL, Sutherland DS, Dige I, Nyengaard JR, et al. pH landscapes in a novel five-species model of early dental biofilm. *PLoS One.* 2011;6(9):e25299.

Shah HN, Collins DM. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol.* 1990; Apr;40(2):205-8.

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

Shibata Y, Fujimura S, Nakamura T: Purification and partial characterization of an elastolytic serine protease of *Prevotella intermedia*. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(7):2107-11.

Silva TA, Rodrigues PH, Ribeiro RN, Noronha FS, Farias Lde M, Carvalho MA Hemolytic activity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* strains: influence of abiotic factors in solid and liquid assays. *Res Microbiol*. 2003; Jan-Feb;154(1):29-35.

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

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

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002; 28:12-55.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 135–87.

Standar k, Kreikemeyer B, Redanz S, Münter WL, Laue M, Podbielski A. Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens. *PLoS ONE*. 2010; 5 (10): e13135.

Stingu CS, Schaumann R, Jentsch H, Eschrich K, Brosteanu O, Rodloff AC. Association of periodontitis with increased colonization by *Prevotella nigrescens*. *J Investig Clin Dent*. 2013;4(1):20-5.

Sunde PT, Olsen I, Göbel UB, Theegarten D, Winter S, Debelian GJ, Tronstad L, Moter A. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. *Microbiology*. 2003; 149:1095–1102.

Taylor-Robinson D; Aduse-Opoku J; Sayed P; Slaney JM; Thomas BJ; Curtis MA. Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; 21:755-57.

Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:210-3.

Urbán E , Terhes G , Radnai M, Gorzó I, Nagy E. Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. *Anaerobe*. 2010;16: 283 -8.

van Winkelhoff AJ, Appelmek BJ, Kippuw N, de Graaff J. K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiol Immunol*. 1993;8(5):259-65.

Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(2):107-12.

Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013;28(2):83-101.

- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS: Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27: 648-57.
- Yanagisawa M, Kuriyama T, Williams DW, Nakagawa K, Karasawa T. Proteinase activity of *Prevotella* species associated with oral purulent infection. *Curr. Microbiol*.2006; Vol. 52: 375–78.
- Yakob M, Soder B, Meurman JH, Jogestrand T, Nowak J, Soder P-O. *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with signs of carotid atherosclerosis in subjects with and without periodontitis. *J Periodont Res*. 2011; 46:749–55.
- Yamanaka T, Furukawa T, Matsumoto-Mashimo C, Yamane K, Sugimori C, Nambu T, Mori N, Nishikawa H, Walker CB, Leung KP, Fukushima H. Gene expression profile and pathogenicity of biofilm-forming *Prevotella intermedia* strain 17. *BMC Microbiol*. 2009; Jan 16;9:11.
- Yamanaka T, Yamane K, Furukawa T, Matsumoto-Mashimo C, Sugimori C, Nambu T, Obata N, Walker CB, Leung KP, Fukushima H. Comparison of the virulence of exopolysaccharide-producing *Prevotella intermedia* to exopolysaccharide non-producing periodontopathic organisms. *BMC Infect. Diseases*. 2011; 11: 228-37.
- Yamane K, Yamanaka T, Yamamoto N, Furukawa T, Fukushima H, Walker CB, et al. A novel exopolysaccharide from a clinical isolate of *Prevotella nigrescens*: purification, chemical characterization and possible role in modifying human leukocyte phagocytosis. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(1):1-9.
- Yoshida A, Tachibana M, Ansai T, Takehara T. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of black-pigmented *Prevotella* species in oral specimens. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20: 43-6.
- Yoshida A, Ansai T, Takehara T, Kuramitsu HK. LuxS-Based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Appl Env Microbiol*. 2005; 71(5): 2372-80.
- Yu F, Iyer D, Anaya C, Lewis JP. Identification and characterization of a cell surface protein of *Prevotella intermedia* 17 with broad-spectrum binding activity for extracellular matrix proteins. *Proteomics*. 2006;6(22):6023-32.
- Zambon JJ, Reynolds HS, Slots J. Black-pigmented *Bacteroides spp.* in the human oral cavity. *Infect Immun*.1981; 32: 198-203.
- Zijnge V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 2010;5(2):e9321.

ANEXO A - Desenho esquemático que representa os complexos microbianos encontrados no biofilme oral

Figura A.1: Desenho esquemático que representa os complexos microbianos encontrados no biofilme oral.

Fonte: Socransky e Haffajee, 2005.

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido

ESTUDO: “Interações de isolados clínicos de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* com *Porphyromonas gingivalis* na formação de biofilmes”.

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____, residente e domiciliado na _____, portador da Cédula de identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido(a) em ____ / ____ / ____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “**Interações de isolados clínicos de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* com *Porphyromonas gingivalis* na formação de biofilmes**”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possa descobrir a relação entre os micróbios presentes na boca, principalmente aqueles que ficam na gengiva, e a causa de doenças infecciosas. Este conhecimento poderá trazer benefícios para a prevenção desta doença (periodontite);
- II) O material clínico (bactérias orais) será empregado neste trabalho científico para pesquisar a presença e associação de bactérias com a doença periodontal. A coleta das amostras será feita pelo cirurgião dentista, com instrumento esterilizado, em uma única coleta, de três sítios. Além disso, serão somente verificadas as condições clínicas bucais, com relação às doenças da gengiva;
- III) A remoção do material para estudo poderá causar desconforto, sangramento leve e dor. Entretanto estes sintomas são de curta duração e rápida recuperação, não ocasionando nenhum problema futuro;
- IV) Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão o meu tratamento; não vão me curar e não vão me causar nenhum problema;
- V) A participação neste projeto não tem objetivo me submeter a um tratamento, bem como não me causará prejuízo financeiro com relação aos procedimentos clínicos ou terapêuticos realizados com o estudo;

- VI) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação ou justificativa;
- VII) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Também não irá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VIII) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- IX) Entendo que minha participação é voluntária e não serei recompensado financeiramente por ela.

Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

- ☐ Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
☐ Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de 2009.

() Paciente/() Responsável

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto:

CD Graziela Murta Barbosa
Departamento de Microbiologia – ICB/USP
Cirurgiã – Dentista – CROSP 55421
Telefone para contato: 5044-1180

Orientadora

Profa. Dra. Maria Regina Lorenzetti Simionato
Departamento de Microbiologia – ICB/USP
Cirurgiã – Dentista – CROSP 17773
Telefone para contato: 11 3091-7201