

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/44519

IB/81627



UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**T/UNICAMP
OL4i**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Angela Bonifácio Barbosa de Oliveira

**“IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
Porphyromonas gingivalis. TESTES DE ADESÃO E
INVASÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS *IN VITRO*.”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Angela Bonifácio Barbosa de Oliveira e aprovada pela Comissão Julgadora.

Angela Bonifácio Barbosa de Oliveira

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Silvia Viccari Gatti

Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro

2000



UNIDADE	IB	85627
N.º CHAMADA:	+ UNICAMP	
	0241	
V.	Ex.	
TOMBO BC/	44519	
PROC.	16-392102	
C	<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00	
DATA	16/05/04	
N.º CPD		

CM-00155204-B

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

OL4i

Oliveira, Angela Bonifacio Barbosa de.

“Identificação e caracterização de Porphyromonas gingivalis : testes de adesão e invasão em células epiteliais in vitro” / Angela Bonifacio Barbosa de Oliveira. -- Campinas, SP : [s.n.], 2000.

87f. : il.

Orientador: Maria Silvia Viccari Gatti.

Co-orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro.

Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Células epiteliais. 2. Células - Adesão. 3. Periodontite.
4. Microbiologia. I. Gatti, Maria Silvia Viccari. II. Castro, Antonio Fernando Pestana de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

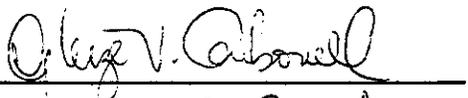
Data da defesa: 24/01/2001

Banca examinadora

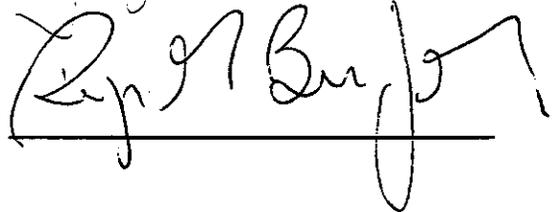
Prof^a. Dr^a. Maria Silvia Viccari Gatti (orientadora)



Prof^a. Dr^a. Gleize Villela Carbonell



Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves



Prof^a. Dr^a. Clarice Weiss Arns

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário.*

(Albert Einstein)

*A morte do homem começa no
instante em que ele desiste de
aprender.*

(Albino Teixeira)

*À minha família, mãe, irmãos, tios
e primos, por todo apoio,
incentivo, por tudo.*

AGRADECIMENTOS

Aos amigos do laboratório de virologia:

Ana Lúcia Rodrigues da Soledade
Daniel Roberto Coradi Freitas
Daniele Masseli Rodrigues
Débora Lopes da Silva
Fabiana Estelles
Fernando Vicentini
Ismar Rocha Haga
Rovilson Giglioli
Sandra Soares Martins
Silvério Takao Hosomi
Verena Hildegard Gyarfas Wolf

Aos amigos:

Adriana de Souza Penteado
Adriana Petito de Almeida Castro
Alessandra Ferreira
Carolina Lotufo Bueno Bartolomei
Celso Ricardo Maas
Cesar Augusto Maas
Cristiane Nucci
Eliana de Almeida Leite
Gerson Nakazato
Helena Galicchio Domingues
Isildinha Diniz Barbosa
Keila Jordão Ribeiro Pagnani
Leila Aidar
Lia Treptow Coswig
Luciana Maria de Hollanda
Marcello Lancellotti
Maria de Lourdes Fagundes
Michelle Angelini
Mirtis Maria Giaciani Ferraz
Paula Salek Siqueira Porto
Regiani Jacobusi
Regina Célia Freitas D'arce
Renata Servan de Almeida
Rosângela Maria Viola
Zaira Priess

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Dr^a. Silvia Gatti, pelos conhecimentos, confiança, paciência e amizade que me foram conferidos;

Ao Dr. Pestana, pela co-orientação, ensinamentos, amizade e carinho com os quais sempre pude contar;

Ao Paulo, pelo incentivo, paciência e companheirismo;

À Fundação André Tosello, pelas informações que me foram fornecidas a respeito de anaeróbios e pelo depósito das minhas amostras;

Aos amigos do Instituto Agronômico de Campinas, Carlos Colombo, Sérgio Carbonell e Walter Siqueira, pela grande contribuição e amizade;

Aos animais que colaboraram com a vida para a execução desta dissertação;

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Clarice W. Arns, Domingos da Silva Leite, Lucila Costallati Ricci, Wanderley Dias da Silveira e Wirla Tamashiro;

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Francisco Humberto Nociti Júnior e Antonio Wilson Salum, pela extraordinária cooperação na coleta de amostras;

À Dr^a Gleize Villela Carbonell, pela amizade, confiança, excepcional colaboração na revisão deste trabalho e também pela participação na banca final;

Ao Dr. Tomomasa Yano, pela amizade e revisão desta dissertação;

Ao Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, pela cessão das amostras, pelas valiosas dicas, inestimável prestância e pela participação na banca definitiva;

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP;

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES);

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução desta dissertação.

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Porphyromonas gingivalis*. TESTES DE ADESÃO E INVASÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS *IN VITRO*

Porphyromonas gingivalis é um dos agentes etiológicos envolvidos na periodontite. Os objetivos do trabalho foram isolar *P. gingivalis* da bolsa periodontal de pacientes com periodontite, identificá-la por métodos tradicionais e através de PCR, realizando com essas amostras testes de adesão e invasão, inibição desses fenômenos em células epiteliais KB com soros humano e fetal bovino, além de açúcares (D-manose, D-manosamina, N-acetil-galactosamina, D-galactosamina, N-acetil-galatosamina e α -D-fucose). O microrganismo foi isolado de pacientes com doença periodontal e sua identificação foi realizada com os testes de produção de pigmento escuro em ágar sangue, coloração de Gram, crescimento sob atmosfera anaeróbia, aglutinação de eritrócitos de carneiro e reação em cadeia da polimerase (PCR). Quatro amostras de *Porphyromonas gingivalis* isoladas dos pacientes foram testadas no PCR, sendo que uma delas não apresentou a seqüência gênica para a fímbria característica. Após a identificação, a amostra padrão ATCC 33277 e duas amostras positivas também em PCR, foram testadas em células KB para a verificação de sua capacidade de adesão e invasão, utilizando-se para a visualização dos testes a coloração de Kinyon e também a reação de imunoperoxidase, com anti-soro produzido em coelhos albinos, a partir da inoculação da amostra padrão inativada. Todas as amostras testadas foram capazes de aderir e invadir células e essa capacidade foi inibida com o pré-tratamento das células com soro humano e soro fetal bovino. A aglutinação também foi inibida quando as hemácias foram tratadas da mesma forma, o mesmo não ocorrendo quando as bactérias foram tratadas com os soros e quando os açúcares foram testados, tanto nas células como nas bactérias. O sobrenadante da cultura de *P. gingivalis* foi testado sobre as monocamadas celulares e verificou-se a destruição celular.

ABSTRACT

***Porphyromonas gingivalis* IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION TESTS. *IN VITRO* ADHESION AND INVASION ON EPITHELIAL CELLS.**

Porphyromonas gingivalis, a gram negative anaerobic bacterium, is one of the etiological agents responsible for periodontitis and produces a variety of virulence factors. The aim of this study was not only to isolate and identify *P. gingivalis* from periodontal pocket of periodontitis patients using traditional and PCR methodologies, but also to observe their process of adhesion and invasion on epithelial cells (epidermoid, carcinoma, oral, HeLa markers - KB). We studied also the capability of human and calf sera and several kinds of sugars to impair cellular adhesion and invasion. The pathogen was isolated from patients with periodontal disease and its identification was performed by dark pigment production on blood agar, Gram staining, growth under anaerobic atmosphere, sheep blood agglutination tests and polymerase chain reaction (PCR). Four colonies of the isolates were tested by PCR for the fimbriae of this pathogen. One of them did not present the genomic sequence for the fimbriae of the bacteria. *P. gingivalis* ATCC 33277 and two PCR positive strains were tested on cells to verify the adhesion and invasion capability. Bacteria/cells interactions results were observed by Kinyon staining and immuperoxidase reaction, using rabbit anti *Porphyromonas gingivalis* antibody. All the tested strains were able of adhering and invading cells and this interaction was inhibited by pre-treatment of the cells with either human or calf serum. The sheep red blood cells agglutination was also inhibited when sheep blood was pre-treated similarly. When the bacteria and the cells were treated with sera or sugars the adhesion and agglutination were not inhibited. The *P. gingivalis* culture supernatant was tested on cell monolayers, showing destruction of them after one hour incubation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	1
2. OBJETIVOS:	17
3. MATERIAL E MÉTODOS:	18
3.1. COLETA DE ESPÉCIMES PARA ISOLAMENTO DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> :.....	18
3.2. AMOSTRAS PADRÃO.....	19
3.3. IDENTIFICAÇÃO DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	20
3.3.1. <i>Produção de pigmento negro:</i>	20
3.3.2. <i>Coloração de Gram:</i>	21
3.3.3. <i>Crescimento sob atmosfera anaeróbia (teste da respiração):</i>	21
3.3.4. <i>Produção de catalase:</i>	22
3.3.5. <i>Aglutinação de eritrócitos de carneiro:</i>	22
3.3.6. <i>Produção de anti-soro anti Porphyromonas gingivalis:</i>	23
3.3.7. <i>Dot-blot:</i>	25
3.3.8. <i>PCR (Reação em cadeia da polimerase):</i>	26
3.3.8.1. <i>Extração de DNA</i>	27
3.4. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO IDEAL DE CÉLULAS PARA A REALIZAÇÃO DOS TESTES DE ADESÃO E INVASÃO DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	28
3.5. TESTE DO EFEITO DO SOBRENADANTE DA CULTURA DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> SOBRE AS MONOCAMADAS CELULARES.....	30
3.6. TESTE DE ADESÃO DA <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> ÀS CÉLULAS KB.....	30
3.7. TESTES DE INVASÃO DA <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> ÀS CÉLULAS KB.....	32
3.8. REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE.....	33
3.9. TESTE DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> ÀS CÉLULAS KB COM O USO DE SORO HUMANO, SORO FETAL BOVINO E AÇÚCARES.....	34
3.10. TESTE DE INIBIÇÃO DA AGLUTINAÇÃO DE ERITRÓCITOS DE CARNEIRO POR <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> COM AÇÚCARES, SORO HUMANO E SORO FETAL BOVINO.....	35
4. RESULTADOS	37
4.1. RESULTADOS DOS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>P. GINGIVALIS</i>	37
4.2. RESULTADOS DOS TESTES DE ADESÃO E INVASÃO DE <i>P. GINGIVALIS</i> EM MONOCAMADAS CELULARES.....	39
5. DISCUSSÃO	52

6. CONCLUSÕES:	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-Placa de ágar sangue contendo hemina, com colônias pequenas, convexas, delimitadas e pigmentadas de negro, características de <i>P. gingivalis</i>	40
Figura 2-Resultado do teste de PCR para detecção da fimbria de <i>P. gingivalis</i>	40
Figura 3-Testes de adesão de <i>P. gingivalis</i> às células KB visualizada através da coloração de Kinyon. Amostra padrão ATCC33277.....	43
Figura 4-Testes de adesão de <i>P. gingivalis</i> às células KB visualizada através da reação de imunoperoxidase. Amostra padrão ATCC 33277.....	44
Figura 5-Testes de adesão de <i>P. gingivalis</i> às células KB visualizada através da reação de imunoperoxidase. Amostras I-10 e I-5.....	45
Figura 6-Teste de invasão de <i>P. gingivalis</i> às células KB visualizado através da reação de imunoperoxidase. Amostra padrão ATCC 33277.....	46
Figura 7- Teste de invasão de <i>P. gingivalis</i> às células KB visualizado através da reação de imunoperoxidase. Amostras I-5 e I-10.....	47
Figura 8-Testes de inibição da adesão de <i>P. gingivalis</i> às células KB através do pré-tratamento das células com soro humano e soro fetal bovino. Amostra padrão ATCC 33277.....	49
Figura 9- Testes de inibição da adesão de <i>P. gingivalis</i> às células KB através do pré-tratamento das bactérias com soro humano, soro fetal bovino e açúcares. Amostra padrão ATCC 33277.....	50
Figura 10- Testes de inibição da adesão de <i>P. gingivalis</i> às células KB através do pré-tratamento das células, ou das bactérias, com soro humano, soro fetal bovino e açúcares. Amostras I-5 e I-10.....	51

1. INTRODUÇÃO:

As doenças periodontais são doenças inflamatórias crônicas induzidas por bactérias, sendo a maior causa da perda de dentes na população adulta (Dehpande *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 1994). São amplamente distribuídas e representam o maior problema de saúde oral, tanto nos países industrializados como naqueles em desenvolvimento (Ali *et al.*, 1997).

Durante as últimas décadas estudos epidemiológicos têm sugerido que a periodontite é universal, que começa logo nos primeiros anos de vida e sua severidade aumenta com a idade (Timmerman *et al.*, 1998). É uma doença comum, progressiva, representando um processo complexo que envolve fatores tanto microbiológicos como imunológicos e pode afetar grande parte da população (Griffen *et al.*, 1998; Kontani *et al.*, 1997).

As doenças periodontais estão presentes em quase todas as pessoas com dentes naturais sendo, no mundo todo, causa indutora da perda destes. Em média 60% das extrações dentárias, após os quarenta anos de idade, estão relacionadas a estas doenças (Polson and Goodson, 1984).

Ao longo dos anos, evidências que suportam a etiologia microbiana das doenças periodontais têm sido acumuladas e várias espécies potencialmente benéficas e patogênicas sugeridas. Apesar de incompletos, os estudos dessa etiologia e da patogênese dessas doenças permitem aos periodontistas darem a seus pacientes melhores terapias baseadas em evidências científicas (Colombo *et al.*, 1998).

A periodontite não é causada por patógenos estranhos que invadem a cavidade oral mas, preferencialmente, pela colonização subgengival por habitantes da microbiota oral, que também estão presentes na ausência de doença (Theilade, 1986).

A complexidade da microbiota subgengival tem sido reconhecida desde o primeiro estudo desse ecossistema com a utilização de microscópio realizado por Van Leeuwenhoek em 1683. Desde então, vários estudos avaliaram a composição da placa dental utilizando microscópios de luz e eletrônico, técnicas de cultura e, mais recentemente, técnicas de sonda de DNA e reações sorológicas (Socransky *et al.*, 1998).

Todas as técnicas reforçam a teoria de que a placa subgengival é composta por uma complexa mistura de espécies bacterianas e os microrganismos que colonizam com sucesso os dentes e a área subgengival precisam coexistir com muitas outras espécies, sendo estimado 400 ou mais delas residindo nessas regiões (Lamont and Jenkinson, 1998; Socransky *et al.*, 1998). Logo, a formação da placa é resultado de uma simbiose com cooperação de muitas espécies bacterianas, sendo por exemplo, necessários anaeróbios facultativos para a produção de um meio ambiente reduzido favorável para o crescimento dos anaeróbios estritos que, por sua vez, suprem outros microrganismos com seus substratos (Theilade, 1986).

A colonização bacteriana subgengival que causa a periodontite pode ocorrer somente se a placa supragengival e a gengivite estiverem presentes. A placa subgengival desenvolve-se sob a placa supragengival, mas isto não é

simplesmente uma continuação apical da mesma composição. Certas bactérias, principalmente bastonetes gram negativos e espiroquetas, e também algumas bactérias gram positivas, possuem melhor habilidade para colonizar a bolsa periodontal que outras (Lamont and Jenkinson, 1998).

A placa subgingival freqüentemente caracteriza-se por uma zona com espécies gram negativas, localizadas adjacentes ao revestimento epitelial da bolsa, enquanto os bastonetes gram positivos e cocos formam uma firme faixa aderente sobre a superfície do esmalte ou da raiz (Socransky *et al.*, 1998).

Há claras diferenças da microbiota entre os sítios com saúde periodontal e aqueles com diferentes formas de periodontite. O sulco gengival saudável abriga relativamente pequena quantidade de microrganismos, enquanto que na gengivite experimental há um grande crescimento destes, assim como um aumento na freqüência de certas espécies, com a mudança da microbiota para uma população gram negativa, que corresponde a 75% dos colonizadores subgingivais na periodontite crônica (Dzink *et al.*, 1985; Griffen *et al.*, 1998; Lamont and Jenkinson, 1998; Lamont *et al.*, 1995; McGraw *et al.*, 1999; Polson and Goodson, 1984).

Uma colonização microbiana no sulco gengival com quantidade acima do normal pode provocar gengivite, levando em algumas áreas à doença periodontal destrutiva (Theilade, 1986).

Um levantamento epidemiológico mostrou uma grande correlação entre a quantidade de placa presente e a extensão da perda do tecido de suporte periodontal, o mesmo valendo para o cálculo dental, isto é, a placa dental calcificada (Kommman *et al.*, 1991; Timmerman *et al.*, 1998). Assim, a colonização

da cavidade oral por certas bactérias pode ser um fator de risco para o início da periodontite (Genco, 1996; Timmerman *et al* 1998).

A gengivite pode ser responsável pela progressão para a doença periodontal (Tanner *et al.*, 1998), porém a razão pela qual alguns indivíduos com gengivite desenvolvem periodontite ainda é fonte de intensivas pesquisas. Recentemente, vários fatores de risco e indicadores de progressão da doença têm sido identificados (Timmerman *et al.*, 1998).

As células epiteliais gengivais representam a primeira barreira para a infecção pelos patógenos periodontais, funcionando como sensores de infecção bacteriana, gerando e transmitindo sinais entre bactérias e as células imunológicas adjacentes e subjacentes nos tecidos periodontais. Muitas espécies bacterianas que iniciam infecções podem ser internalizadas e subverter os eventos de processamento de informações que controlam esses sinais (Lamont and Jenkinson, 1998; Zhang *et al.*, 1999).

Seguindo a entrada e ligação, as bactérias orais precisam ser hábeis para utilizar os nutrientes disponíveis para que possam multiplicar-se na cavidade oral. Os fatores do hospedeiro que tendem a resistir à colonização incluem os movimentos de força da língua, juntamente com o fluxo salivar e o escoamento do fluido gengival. Além disso, moléculas específicas de saliva podem agregar organismos e promover sua eliminação pelo processo de expectoração e deglutição (Theilade, 1986). Antagonismos bacterianos também são importantes para a regulação dos microrganismos subgengivais. Seu crescimento torna-se limitado pela competição por nutrientes, pelo acúmulo de produtos metabólicos

inibitórios e também por bacteriocinas produzidas por algumas bactérias (Theilade, 1986).

Na ausência de higiene oral eficiente e diária há o desenvolvimento de placa gengival e gengivite em pessoas de todas as idades. *Streptococcus mitior*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus* e *Actinomyces naeslundii* são os pioneiros e a inflamação ocorre em poucos dias. Em duas ou três semanas a placa torna-se colonizada por uma microbiota complexa, com certas espécies de *Actinomyces* e *Bacteroides* encontradas em maiores proporções (Lamont and Jenkinson, 1998).

Os bastonetes gram negativos e as espiroquetas não podem formar placa sem a ajuda de espécies gram positivas, e parecem levar vantagem na presença de placa e gengivite, onde não haveria barreiras para o seu crescimento no interior da bolsa, com disponibilização de nutrientes essenciais como hemina, proteínas do soro e, possivelmente, hormônios corticosteróides que são fornecidos pelo hospedeiro, através do exudato gengival (Theilade, 1986).

Vários fatores de virulência bacterianos estão implicados na destruição dos tecidos, direta ou indiretamente, devido às suas potencialidades em causar inflamação. Em casos de doença algumas bactérias indígenas têm um papel maior que outras, dado seu aumento na proporção e no número absoluto e por terem fatores de virulência relevantes, como aqueles que provocam distúrbios nas defesas do hospedeiro (Fletcher *et al.*, 1995).

Algumas espécies inibem a fagocitose reduzindo a quimiotaxia dos fagócitos ou inibindo sua adesão, ou ainda liberando toxinas como a leucotoxina

produzida por *Actinobacillus actinomycetencomitans* (Kato *et al.*, 1995; Theilade, 1986). Outras produzem enzimas proteolíticas que degradam as substâncias intercelulares do epitélio, colágeno, fibronectina, imunoglobulinas, fatores do sistema complemento, lisozima e outras. A liberação desses produtos provoca a destruição crônica dos tecidos periodontais, isto é, gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar (Chen *et al.*, 1992; Fravallo *et al.*, 1996; Greenstein and Caton, 1990; Lamont *et al.*, 1995; Lamont and Jenkinson, 1998; Nelson *et al.*, 1999), além de enfraquecer a função da barreira epitelial de maneira a permitir a penetração de várias substâncias tóxicas e antigênicas, provocando inflamação, com recrutamento de neutrófilos e liberação de grânulos lisossomais contendo proteases (Cardoso, 1997; Kaminishi *et al.*, 1993; Theilade, 1986).

Os neutrófilos tendem a se concentrar junto às fibras colágenas do tecido gengival e a microbiota patogênica, frente a uma boa função destes, gera apenas gengivite e uma doença limitada. Caso contrário, a exposição segue com absorção de toxinas bacterianas e provoca uma resposta sistêmica aumentada, induzindo a sinalização de monócitos e linfócitos para a área da inflamação e subsequente destruição do colágeno. Então, pelo menos dois fatores estão envolvidos na resposta inflamatória que gera a perda de inserção. Um deles seria a presença de bactérias e seus produtos e o outro a própria destruição tecidual causada pelas células de defesa. A patogenia das doenças periodontais inclui fatores genéticos, ambientais e de risco adquirido, que influenciam significativamente na resposta do hospedeiro aos desafios microbianos, gerando diferentes reações. Alguns fatores agravantes incluem o diabetes, a síndrome de

Down, pacientes com neutropenia, anemia, portadores do vírus da imunodeficiência humana e fumantes (Cardoso, 1997).

O resultado final desse processo é a manifestação clínica da doença, com sinais e sintomas distintos, incluindo evidência radiográfica de perda óssea e aumento da profundidade da bolsa periodontal (Fine, 1992), com eventual esfoliação do dente (Lamont *et al.*, 1995; Lamont and Jenkinson, 1998).

Entre os microrganismos subgingivais caracterizados até agora, vários bacilos gram negativos são de especial importância na etiologia das periodontites. Certas bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* sp e *Actinobacillus actinomycetengencomitans* estão presentes em grande quantidade nas doenças periodontais inflamatórias, possuem vários dos mecanismos já citados que lhes conferem capacidade para sobreviver no interior da bolsa (Theilade, 1986).

P. gingivalis é o principal agente etiológico no início e progressão de formas severas de periodontite (Ebersole and Steffen, 1995; Lamont *et al.*, 1992; McGraw *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 1999; Tuite-McDonnell *et al.*, 1997; Weinberg *et al.*, 1997). Esse microrganismo utiliza múltiplos fatores de virulência para evadir às defesas do hospedeiro (Griffen *et al.*, 1998; Lamont *et al.*, 1995; McGraw *et al.*, 1999) e está normalmente entre os últimos colonizadores da cavidade oral, requerendo organismos antecedentes para criar as condições do meio ambiente necessárias, tais como sítios de ligação pela adesão de interespecies, suprimento de substratos de crescimento e redução da tensão de oxigênio a níveis mínimos

requeridos para a sobrevivência e crescimento de anaeróbios obrigatórios (Lamont and Jenkinson, 1998).

Um estudo feito através da reação em cadeia da polimerase (PCR) detectou *P. gingivalis* em apenas 25% dos pacientes com gengiva saudável, contra 79% do grupo com periodontite (Griffen *et al.*, 1998).

Como um patógeno oportunista a *P. gingivalis* pode também existir em harmonia comensal com o hospedeiro, com episódios de doença resultando em uma mudança no balanço ecológico dentro do complexo microambiente periodontal. Seus fatores de virulência incluem atividade tipo tripsina, enzima colagenolítica, cápsula polissacarídica, fímbrias, citotoxinas e proteases hidrolíticas (Bird *et al.*, 1995; Fravallo *et al.*, 1996; Lamont *et al.*, 1995). A presença deste patógeno, agindo tanto sozinho como em infecção mista com outras bactérias, na ausência de espécies benéficas e havendo certas deficiências imunológicas no hospedeiro, parece ser essencial para a atividade da doença (Lamont and Jenkinson, 1998).

Interações da *P. gingivalis* com o sistema imune do hospedeiro acredita-se ser a base da resposta inflamatória destrutiva, a qual é característica dessa doença, e a interação íntima dessa bactéria com o hospedeiro tem sido objeto de intensa investigação (Kinane *et al.*, 1999).

A família *Bacteroidaceae* é composta por bastonetes gram negativos. Alguns são fusiformes, outros são filamentosos e outros ainda produzem células bizarras que degeneram em esferoplastos ou formas L. Não esporulam e a maioria das espécies são imóveis. São anaeróbios estritos e necessitam da

adição de alguns nutrientes ao meio de cultura para o seu bom crescimento como sangue, soro, extrato de levedura e outros fatores de crescimento. A família compreende três gêneros principais: *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Leptotrichia*. (Topley *et al.*, 1990).

Em 1988, as espécies do gênero *Bacteroides* produtoras de pigmento e assacarolíticas, todas isoladas de humanos, foram reclassificadas dentro do gênero *Porphyromonas* como *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* (Shah and Collins, 1988). São bastonetes curtos (0,5-0,8 x 1,0-3,0 μm), não esporulam e são imóveis. Geralmente as células formam colônias de cor marrom a negro em ágar sangue devido à produção de protoheme (Holt *et al.*, 1994). A hemina é estocada na superfície da célula, dando às bactérias a característica de colônias com pigmento escuro (Lamont and Jenkinson, 1998).

As três espécies utilizam substratos de nitrogênio, como tripticase ou proteose peptona, como fonte de energia e possuem uma limitada habilidade para fermentar aminoácidos (Bolows *et al.*, 1991). São bactérias gram negativas, com temperatura ótima de crescimento a 37°C e seus principais produtos finais são os ácidos acético, butírico, fenil-acético, isovalérico e succínico (Holt *et al.*, 1994).

A espécie *Porphyromonas asaccharolytica* pode ser isolada de sítios a uma grande distância da cavidade oral como cervix uterino, ouvido, intestino e genitália. Porém, a *P. gingivalis* parece colonizar exclusivamente sítios subgingivais da cavidade oral, mas também já foi detectada na língua, amídalas, saliva e, raramente, na placa dental supragengival (Bolows *et al.*, 1991; van Winkelhoff, *et*

al., 1985). A maioria das amostras de *Porphyromonas* isoladas da cavidade oral são *Porphyromonas gingivalis*. A maior parte dos isolados clínicos de *Porphyromonas* de outras regiões anatômicas em humanos são *P. asaccharolytica*, enquanto que *Porphyromonas endodontalis* pode ser isolada de canais radiculares infectados e outros sítios da cavidade oral (Koneman *et al.*, 1997).

Crítérios para a diferenciação de *Porphyromonas gingivalis* de outras espécies de *Porphyromonas* são a atividade tipo tripsina deste microrganismo (Fujimura and Nakamura, 1987), a aglutinação de eritrócitos de carneiro e a produção de ácido fenilacético (Holt *et al.*, 1994).

A mobilidade eletroforética de malato desidrogenase (MDH) e as diferenças nas bases de DNA também diferenciam as três espécies de *Porphyromonas* (Bollows *et al.*, 1991).

São seis os sorotipos de *Porphyromonas gingivalis*: ATCC 33277, W50, A7A1-28, ATCC 49417, HG 1690 e HG 1691. Esses sorotipos são baseados nos diferentes antígenos polissacarídicos que, provavelmente, representam estruturas capsulares e são designados como antígenos K (Ebersole and Steffen, 1995; Laine *et al.*, 1996; Laine *et al.*, 1997).

A *P. gingivalis* é um microrganismo assacarolítico, com requerimento por hemina como fonte de ferro e peptídios para o crescimento. Açúcares como a glicose podem ser utilizados por ele, mas tais compostos não são convertidos em produtos finais metabólicos e sim usados para a biossíntese de macromoléculas intracelulares (Lamont and Jenkinson, 1998). Entre os vários substratos de

nitrogênio disponíveis na boca, esse patógeno tem somente uma habilidade limitada para fermentar aminoácidos livres, com possível exceção ao ácido aspártico e asparagina, os quais podem ser metabolizados através de oxaloacetato, malato e fumarato produzindo succinato. Em contraste, peptídios são eficientemente utilizados para seu crescimento. Então, a ação de enzimas proteolíticas produzidas por essa bactéria, junto com outras proteases derivadas do hospedeiro e de outros patógenos no meio subgengival rico em proteínas, parece ser essencial para a aquisição de nutrientes para *P. gingivalis* (Lamont and Jenkinson, 1998).

Entretanto, parece lhe faltar um sistema sideróforo e utiliza hemina para satisfazer essa necessidade. Vários compostos contendo hemina, como a hemoglobina, haptoglobina, mioglobina, hemopexina, metahemoglobina, oxihemoglobina, albumina, lactoperoxidase, catalase e citocromo c podem prover hemina, seguindo o processo proteolítico. A hemina está presente na superfície das células, fator considerado responsável pelas características aparentes de colônias escuras de *P. gingivalis*. A molécula de hemina intacta pode ser transportada para o interior da célula em um processo dependente de energia e regulado pelos níveis de hemina disponíveis (Lamont and Jenkinson, 1998).

Hemaglutininas e proteinases são produzidas para suprir esses requerimentos. As hemaglutininas são fatores de virulência de muitas espécies bacterianas e *P. gingivalis* produz pelo menos cinco delas. Quando expressas na superfície da célula bacteriana, as hemaglutininas podem promover colonização mediando a ligação da bactéria aos receptores (usualmente oligossacarídios) das

células humanas.

Se *P. gingivalis* utiliza hemina para o seu crescimento a ligação das bactérias aos eritrócitos pode também servir como função nutricional (Lamont and Jenkinson, 1998).

Recentes estudos sugerem que a hemaglutinação por este patógeno pode ser mediada por fimbria. Muitas das propriedades virulentas de *P. gingivalis* parecem ser conseqüência de suas adaptações para obter hemina e peptídios. Então, as hemaglutininas participam nas interações de adesão com a célula do hospedeiro, enquanto as proteinases contribuem para a inativação das moléculas efetoras da resposta imune e destruição do tecido. Além disso, para direcionar o ataque aos tecidos periodontais, a bactéria pode modular sinais de transdução às células eucarióticas. Dentro desse sítio privilegiado a *P. gingivalis* pode replicar e utilizar componentes da defesa inata do hospedeiro (Lamont and Jenkinson, 1998).

O lipopolissacarídeo de *P. gingivalis* está associado com a destruição inflamatória dos tecidos periodontais, pois induz a liberação de citocinas e outros fatores das células inflamatórias, estimulando diferenciação celular osteoclástica e causando reabsorção do osso alveolar (Ito *et al.*, 1997; Kadono *et al.*, 1999). As interações entre os componentes da membrana externa de *P. gingivalis* e células endoteliais têm sido examinadas, assim como a habilidade do lipopolissacarídeo em estimular uma resposta inflamatória (Deshpande *et al.*, 1998).

Apesar da patogenicidade da *P. gingivalis* ser multifatorial, sua capacidade de aderir aos tecidos orais é um importante passo no processo de colonização

(Amano *et al.*, 1996; Kawata *et al.*, 1997; Lamont *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1997). A cavidade oral possui uma variedade de superfícies nas quais *P. gingivalis* pode aderir. Há os tecidos duros mineralizados, superfícies mucosas incluindo células epiteliais, eritrócitos, gengiva, bochecha e língua, além de outras bactérias orais já aderidas. As moléculas de saliva adsorvidas à superfície dos dentes comumente funcionam como receptores para a aderência bacteriana (Amano *et al.*, 1996).

O sistema de defesa inato do hospedeiro pode funcionar limitando a disseminação da bactéria dentro da bolsa periodontal mantendo a barreira epitelial intacta. Entretanto, vários estudos têm documentado que *P. gingivalis* pode ser encontrada dentro dos tecidos gengivais, sugerindo que a bactéria pode passar através da barreira epitelial. Invasão das células epiteliais por esse patógeno *in vitro* também foi demonstrada por muitos pesquisadores (Deshpande *et al.*, 1998). Esse microrganismo possui um potencial invasivo, internalizando-se ativamente em células epiteliais através de mecanismos similares àqueles utilizados por vários patógenos entéricos (Lamont and Jenkinson, 1998). Tem sido demonstrado que as fímbrias deste patógeno, as quais medeiam sua ligação aos sítios orais (às células epiteliais, às outras bactérias orais e à camada de saliva sobre a hidroxiapatita) (Amano *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1997) e induzem resposta inflamatória no hospedeiro, são um candidato a antígeno em potencial para o desenvolvimento de uma vacina (Sharma *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 1997). O exame ultraestrutural das fímbrias de *P. gingivalis* revela sua presença peritríquica, com 0,3 a 3,0µm de comprimento e 5nm de largura. A principal classe de fímbria é composta de uma subunidade de um monômero de fimbrilina que varia entre 41 e

49 kDa de tamanho (Lamont and Jenkinson, 1998; Ogawa *et al.*, 1995). A análise da seqüência protéica não revela homologia significativa com proteínas fimbriais de outras bactérias, indicando que a fímbria de *P. gingivalis* pode representar uma classe típica de fímbria desta bactéria (Lamont and Jenkinson, 1998).

Estas fímbrias também contribuem para a invasão celular pelo organismo e podem estimular sinais de transdução em células epiteliais da gengiva, induzindo o processo de internalização (Xie *et al.*, 1997).

Também tem sido mostrado que a *P. gingivalis* pode avançar para o interior de camadas epiteliais profundas, processo esse que pode ter um papel na sua disseminação. Ulcerações ocorrem comumente na periodontite, podendo ser o resultado de uma potente produção de proteases por *P. gingivalis* que degradam o colágeno tipo IV presente na membrana basal (Deshpande *et al.*, 1998). Mas a destruição tecidual também está relacionada à hiperativação de neutrófilos, que também liberam essas enzimas no caso de uma reação inflamatória (Cardoso, 1997). O tecido conectivo do periodonto é vascularizado, permitindo a invasão da bactéria na corrente circulatória. Assim, além da invasão de células epiteliais, a habilidade de *P. gingivalis* ativamente invadir células endoteliais pode representar um mecanismo adicional desenvolvido por esse patógeno para evadir à resposta imune do hospedeiro (Deshpande *et al.*, 1998).

As fímbrias de *Porphyromonas gingivalis*, ou seus peptídeos sintéticos, induzem macrófagos periféricos humanos e neutrófilos à produção de várias citocinas pro-inflamatórias, como interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa, os quais são importantes mediadores nas reações inflamatórias do

hospedeiro (Kawata *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1997). Foi demonstrado *in vitro* que as fímbrias podem estimular atividade de reabsorção óssea, sugerindo que estas podem ter um papel na perda do osso alveolar na periodontite (Kontani *et al.*, 1997).

Já foi demonstrado que este patógeno invade e persiste no interior de culturas de células epiteliais, mecanismo este que contribui para seu potencial patogênico (Njoroge *et al.*, 1997). A mesma observação também foi feita por Lamont *et al* (1992 e 1995), enquanto que Madianos *et al* (1996) relacionam a menor patogenicidade de algumas bactérias mutantes à falta de capacidade de se multiplicarem no interior de células e Duncan *et al* (1993) referem-se à invasão não somente como um mecanismo de evasão à resposta imune do hospedeiro, mas também à possibilidade de atingir os tecidos adjacentes. São observados microrganismos no interior dos tecidos periodontais de pacientes com gengivite, gengivite úlcero-necrosante aguda (GUNA) e periodontites adulta, juvenil e refratária. Deshpande *et al* (1998) sugerem que a capacidade de *P. gingivalis* de invadir células do hospedeiro pode alterar a integridade das mesmas.

Bloquear a aderência e subsequente colonização de *P. gingivalis* pode dar um efeito inibidor à doença (Brant *et al.*, 1995). Okuda *et al* (1981) bloquearam a adesão de *P. gingivalis* às células epiteliais com pré-tratamento das bactérias com saliva e soro humano. O que se busca atualmente é uma redução permanente das espécies indígenas mais virulentas a números e proporções compatíveis com a saúde periodontal, mantendo a ecologia da placa desfavorável para essas espécies e favorável para o hospedeiro (Theilade, 1986).

Atualmente a doença periodontal é, no Brasil, uma das causas de perda de dentes entre a população adulta. A falta de informação, a situação sócio-econômica e o próprio temor afastam os pacientes dos consultórios, aumentando os índices de morbidade e perda dental por doença periodontal. Falta motivação para os pacientes fazerem uma adequada higiene oral, além de programas de prevenção de doenças bucais.

Procurar entender os mecanismos pelos quais um patógeno leva a uma determinada doença torna-se necessário visando o controle da mesma.

No presente trabalho objetivou-se isolar *Porphyromonas gingivalis* de bolsas periodontais, comparando seu comportamento frente a uma amostra padrão, e testá-la em células epiteliais *in vitro*, permitindo assim a busca de inibidores (açúcares ou outros constituintes do soro) que possam ser utilizados no controle desse microrganismo, para uma melhora na qualidade da saúde bucal da população.

2. OBJETIVOS:

2.1. Isolar *Porphyromonas gingivalis* a partir de amostras colhidas da bolsa periodontal de no mínimo 5mm de profundidade de pacientes com periodontite moderada ou severa;

2.2. Identificar *Porphyromonas gingivalis* através de métodos convencionais e por PCR (reação em cadeia da polimerase);

2.3. Verificar a adesão e invasão de *Porphyromonas gingivalis* em células KB (Epidermoid carcinoma, oral, human, HeLa markers);

2.4. Verificar a inibição da adesão com açúcares, soro fetal bovino e soro humano.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. COLETA DE ESPÉCIMES PARA ISOLAMENTO DE *Porphyromonas gingivalis*:

Foram selecionados seis pacientes adultos, com doença periodontal moderada ou severa, com bolsa periodontal de no mínimo 5 mm de profundidade que procuraram atendimento odontológico na Clínica de Especialização em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) da UNICAMP.

A coleta foi feita em pacientes que ainda não haviam recebido nenhum tipo de tratamento (antibióticoterapia ou raspagem e alisamento radicular nos últimos seis meses). Os pacientes foram informados verbalmente e por escrito sobre os procedimentos realizados. O termo de concordância com os procedimentos a serem realizados foi assinado antes da coleta.

Para coletar o material da bolsa periodontal foram utilizados cones de papel absorvente estéreis (Renvert *et al.*, 1992), inseridos no interior da bolsa periodontal, permanecendo nela durante 15 segundos. Foram coletadas amostras de duas bolsas periodontais de cada paciente. Logo após a coleta os cones foram semeados com o auxílio de uma pinça clínica em ágar sangue seletivo para *Porphyromonas gingivalis*, contendo bacitracina, ácido nalidíxico e sulfato de colistina como antibióticos seletivos, hemina (5µg/ml, diluída em NaOH 1N) e

vitamina K1 (1µg/ml diluída em 60% de álcool etílico e 40% de água Milli-Q estéril (Hunt *et al.*, 1986).

As placas com ágar sangue foram colocadas imediatamente após a semeadura em jarras de anaerobiose de 2,5L, com conteúdo resultante de dióxido de carbono em torno de 9 a 13%, sem produção de hidrogênio, obtidos com a utilização de kits comerciais (AnaeroGen, OXOID), e incubadas a 37°C por sete dias.

Após o período de incubação foram selecionadas, das doze placas semeadas, quinze colônias escuras (marrons ou negras), pequenas a médias (aproximadamente 1mm), convexas e completamente delimitadas, presuntivas para *Porphyromonas* que foram subcultivadas em ágar sangue em anaerobiose para seu reisolamento, seguido de uma série de testes para sua identificação, como descrito a seguir.

3.2. AMOSTRAS PADRÃO

A amostra padrão controle positivo utilizada em todos os testes realizados foi a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, obtida junto ao ATCC (American Type Culture Collection), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da UNICAMP.

Como controle negativo para os ensaios foram utilizadas as amostras de

Escherichia coli O115 ou K12 e, no caso do teste de produção de catalase, uma amostra de *Staphylococcus aureus*, todas essas da coleção do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

3.3. IDENTIFICAÇÃO DE *Porphyromonas gingivalis*

Para a identificação de *Porphyromonas gingivalis* foram feitos os seguintes testes (Moncla *et al.*, 1994):

3.3.1. Produção de pigmento negro:

A visualização das colônias com pigmento escuro é possível em ágar sangue acrescido de hemina (10µg/ml). Com esse teste é possível diferenciar as espécies produtoras de pigmento negro, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, daquelas não produtoras, como *Fusobacterium nucleatum*, *B. vulgatus*, *B. fragilis*, *Eikenella corrodens* ou ainda espécies de *Capnocytophaga*. Além da produção de pigmento escuro, as colônias indicativas para a espécie devem ser pequenas a médias, convexas e completamente delimitadas (Koneman *et al.*, 1997).

No presente trabalho quinze colônias foram selecionadas apresentando essas características.

3.3.2. Coloração de Gram:

A coloração de Gram é utilizada para observar morfologicamente as bactérias. Assim, bactérias com colônias características, ou seja, pequenas, convexas e delimitadas, que produziram pigmento escuro foram submetidas à coloração de Gram e selecionadas pelas características morfológicas individuais, sendo bacilos curtos, pequenos e gram negativos os presuntivos para *Porphyromonas*.

Foram oito colônias por nós caracterizadas como possíveis membros do gênero *Porphyromonas* identificadas pela coloração de Gram, das quinze previamente selecionadas. As restantes apareceram como bacilos longos, esporulados ou não, portanto não características.

Todas estas colônias foram submetidas aos outros testes bioquímicos, buscando identificar *P. gingivalis*.

3.3.3. Crescimento sob atmosfera anaeróbia (teste da respiração):

Após a identificação das colônias indicativas para *Porphyromonas* nas placas de ágar sangue e coloração de Gram, cada amostra isolada foi semeada (em duplicata) em duas placas contendo ágar sangue. Essas placas foram incubadas, tanto em aerobiose como em anaerobiose (AnaeroGen, OXOID), por sete dias para a diferenciação das espécies anaeróbias estritas das anaeróbias

facultativas e aeróbias, uma vez que somente as anaeróbias estritas crescem em anaerobiose e têm seu crescimento inibido pela presença de oxigênio, como é o caso da *Porphyromonas gingivalis*.

3.3.4. Produção de catalase:

A catalase utiliza o peróxido de hidrogênio produzido durante a respiração normal (aeróbia), transformando-o em água e oxigênio. Os microrganismos anaeróbios obrigatórios não produzem catalase, daí a sua inabilidade para crescer na presença de oxigênio. Esse é um teste confirmatório para o anterior. Foi feito colocando-se em uma lâmina de vidro cultura pura do microrganismo cultivado em ágar Columbia, sem sangue para não haver interferência no resultado, seguido de uma gota de H₂O₂ a 30%. O teste é considerado negativo se nenhuma bolha de ar aparecer com o acréscimo da H₂O₂, o que também é característica de *P. gingivalis*. O *S. aureus* foi utilizado como amostra controle positivo.

3.3.5. Aglutinação de eritrócitos de carneiro:

Das três espécies de *Porphyromonas* isoladas de humanos, a única que tem a capacidade de aglutinar eritrócitos de carneiro é a *Porphyromonas gingivalis*.

Para sua identificação, eritrócitos de carneiro em Alsever foram lavados duas vezes com PBS 0,02M, pH 7,4. 0,75 ml da papa de eritrócitos foram então diluídos em 4 ml do mesmo tampão. As bactérias cultivadas em ágar Columbia por sete dias foram ressuspensas e lavadas com o mesmo tampão duas vezes, por centrifugação a 10.000 rpm por cinco minutos. As células bacterianas foram ressuspensas numa concentração de 5×10^8 bactérias/ml, seguindo-se a escala de McFarland, aproximadamente. A partir dessa suspensão foram realizadas, em microplacas, diluições (razão 2) a partir de 1:2 e 100 μ l de cada uma delas foram colocados para reagir com 100 μ l da suspensão de eritrócitos. Após leve agitação e incubação por aproximadamente três horas, à temperatura ambiente, a reação foi lida.

3.3.6. Produção do anti-soro anti *Porphyromonas gingivalis*:

O anti-soro foi produzido para ser utilizado nos ensaios de dot-blot e reação de imunoperoxidase, como descrito adiante. Quatro coelhos albinos foram utilizados. A amostra padrão de *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 foi cultivada em ágar sangue por sete dias, em anaerobiose, sendo inativada com formol a 4%, lavada com PBS três vezes e diluída de forma a conter 9×10^8 bactérias/ml. O preparo do inóculo foi feito com uma parte do antígeno e três partes de PBS 0,02M, pH 7,4. Em dois coelhos foram feitas seis inoculações intravenosas, segundo o seguinte protocolo (Ewing, 1986):

A primeira inoculação foi feita no dia zero, sendo inoculado 0,1ml; a segunda inoculação após cinco dias em volumes de 0,2ml sendo inoculado nos animais; após sete dias 0,5ml do antígeno foi inoculado, sendo a quarta inoculação (1ml) após onze dias, a quinta inoculação após quinze dias com 2,0ml e a última inoculação após trinta dias, com o mesmo volume anterior (2,0ml).

Nos dois outros coelhos foi inoculado 1ml do antígeno (1 volume) acrescido de adjuvante de Freund (dois volumes), via subcutânea. A primeira inoculação foi feita com o adjuvante de Freund completo e a segunda e última, após vinte e cinco dias, com o adjuvante de Freund incompleto.

Passados vinte e um dias da última inoculação os animais foram sangrados e os soros foram testados por aglutinação em tubo. O soro pré-imune, coletado dos animais antes da primeira inoculação, também foi testado por aglutinação em tubo para a confirmação da não reação com o antígeno utilizado.

Os soros foram diluídos em solução salina 0,15M, nas seguintes diluições: 1:250; 1:500; 1:750; 1:1000; 1:1500 e 1:2000. Em cada tubo contendo 0,5ml de soro diluído foi adicionado 0,5ml da suspensão bacteriana lavada três vezes com PBS e numa concentração de aproximadamente 10^6 bactérias por ml. Nos tubos controle havia somente antígeno e solução salina. Os tubos foram incubados em banho maria a 37°C. A primeira leitura foi feita após duas horas e a segunda após 18 horas. O título da aglutinação em tubo foi de 1:1500 para o soro produzido com adjuvante e de 1:1000 para o soro obtido após as inoculações endovenosas. O soro pré-imune não reagiu, ou seja, não houve aglutinação em nenhuma das diluições testadas.

3.3.7. Dot-blot:

O Dot-blot é uma reação antígeno-anticorpo e foi utilizado como mais um teste para a confirmação de que as amostras que estavam sendo testadas eram *Porphyromonas*, seguindo o protocolo de Haga (1998), com modificações. Para tanto, a membrana de nitrocelulose foi cortada em pequenos quadrados de aproximadamente 10mm e colocados em placas de 24 concavidades. As amostras foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato, 0,2M e pH 9,6, com aproximadamente 10^8 bactérias por ml e foram aplicadas às membranas $10\mu\text{l}$ da diluição. Depois de seca, a membrana foi incubada com soro fetal bovino a 3% diluído em tampão PBS tween 20 a 0,05% (PBS/T) por uma hora, à temperatura ambiente. Após lavagem por três vezes com PBS/T por três minutos, foi acrescentado o anticorpo anti *P. gingivalis* diluído 1:1000 e o sistema foi novamente incubado à temperatura ambiente por mais uma hora. Nova lavagem com PBS/T três vezes foi feita e, em seguida, foi colocada anti igG de coelho marcada com peroxidase (Calbiochen), numa diluição de 1:5000, fazendo-se nova incubação à temperatura ambiente durante uma hora. A lavagem final foi feita (PBS/T) e a reação foi revelada com 5mg de diaminobenzidina (DAB) diluídas em PBS/T acrescidas de $150\mu\text{l}$ de água oxigenada 30 volumes. Como controle negativo foi utilizada a amostra de *E. coli* O115.

3.3.8. PCR (Reação em cadeia da polimerase):

O teste de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizado para a confirmação de todos os testes anteriores utilizados para a identificação das amostras de *Porphyromonas gingivalis* isoladas. Nesta reação foram utilizados os iniciadores para a amplificação da fímbria da *P. gingivalis* (Riggio *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1993), com as seguintes seqüências:

5' ATAATGGAGAACAGCAGGAA 3'

5' TCTTGCCAACCAGTTCCATTGC 3'

Todos os reagentes utilizados neste teste são da marca Gibco-BRL, com exceção dos iniciadores que foram produzidos pela Promicro. Em um microtubo de 200 μ l foram colocados 64,5 μ l de água milli-Q estéril, 10 μ l de tampão de PCR 10 vezes concentrado, 2 μ l de mistura de dNTP, 3 μ l de cloreto de magnésio 50mM, 8 μ l do iniciador 1, 6,5 μ l do iniciador 2, 1,0 μ l de DNA purificado e 5,0 μ l de Taq DNA polimerase, dando um volume total de 100 μ l. Para a amplificação foram utilizados 33 ciclos, após uma desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, com as seguintes temperaturas:

95°C um minuto (desnaturação)

56°C 30 segundos (anelamento dos iniciadores)

72°C um minuto (atividade da Taq polimerase).

Após os 33 ciclos, foi usada uma temperatura de extensão de 72°C por mais dez minutos.

Para a visualização dos resultados os produtos da amplificação foram aplicados em gel de agarose a 2% e submetidos a uma diferença de potencial de 100V. O marcador de peso molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder cat. nº 15628-019 (Gibco BRL). Este gel foi então tratado por 20 minutos com Brometo de Etídio. A observação das bandas foi feita em Transiluminador (High Performance Ultraviolet Transilluminator-UVP-Ultra-Violet Products).

O cálculo do tamanho da banda amplificada foi feito utilizando-se a regressão linear, com as medidas em milímetros obtidas no gel.

3.3.8.1. Extração de DNA

As bactérias foram cultivadas por 48 horas a 37°C em caldo BHI para *Porphyromonas gingivalis* e após centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos foram ressuspensas em 400µl de TE, acrescidas de 50µl de lisozima (10µl/ml) e 5 a 10µl de RNase (10µl/ml). As suspensões foram agitadas em vortex rapidamente e foram então colocadas em estufa a 37°C por 18 horas. Após esse período foram colocados 75µl da solução SDS 10% proteinase K 1,4mg/ml e agitou-se novamente em vortex até o conteúdo ficar transparente, que foi então deixado a 65°C por dez minutos. Acrescentou-se 100µl de NaCl 5M e 100µl da solução CTAB/NaCl (pré-aquecida a 65°C). Nova agitação em vortex foi feita até o líquido ficar leitoso. Levou-se a mistura a banho a 65°C por dez minutos, adicionou-se 750µl da solução clorofórmio-álcool isoamínico (24:1), agitou-se em vortex até a

solução ficar esbranquiçada e a mesma foi então centrifugada a 12.000 rpm por cinco minutos. Cuidadosamente transferiu-se o sobrenadante para um outro tubo (cerca de 600 μ l) e nele foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol a -20° C. Os eppendorffs foram invertidos lentamente e colocados no freezer por pelo menos 30 minutos e centrifugados sete minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e foi então colocado um ml de álcool, sem homogeneizar. Deixou-se os tubos 30 minutos no freezer, que foram então centrifugados por dois minutos a 12.000 rpm e desprezou-se o sobrenadante. Os tubos foram invertidos e colocados em estufa a 37°C por quinze minutos. Acrescentou-se 50 μ l de TE ou água Milli-Q, e os tubos foram levados à geladeira por 18 horas.

A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro a 260nm retirando-se 7 μ l do eppendorff e colocando-se este volume em outro com 693 μ l de água destilada.

3.4. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO IDEAL DE CÉLULAS PARA A REALIZAÇÃO DOS TESTES DE ADESÃO E INVASÃO DE *Porphyromonas gingivalis*

Visando a padronização dos testes de adesão e invasão fez-se necessário, em um primeiro momento, definir o número de células por ml que significasse uma monocamada entre 50 a 70% de confluência, com células viáveis dentro dos

diferentes intervalos de tempo.

A linhagem celular utilizada no presente trabalho foi a KB (Epidermoid, Carcinoma oral, human, HeLa markers), obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ.

O cultivo dessa linhagem foi feito em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C em meio Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo 100U de penicilina e 10µg de estreptomicina por ml de meio.

A monocamada celular foi tripsinizada e as células foram ajustadas para concentrações de $4,5 \times 10^6$ e $2,5 \times 10^5$ células por ml de meio, após contagem em câmara de Neubauer. Essas concentrações foram semeadas em placas de 24 concavidades (1ml por concavidade), contendo lamínulas e incubadas por períodos de 2, 4, 24 e 48 horas. Após as respectivas incubações as lamínulas foram fixadas com metanol secado (Merk) por dez minutos, lavadas em água destilada por dez minutos e coradas com fucsina de Kinyon por uma hora, em temperatura ambiente. Após esse tempo, as lamínulas foram lavadas em água de torneira por cinco minutos, descoradas com álcool-ácido a 2% até o tecido se apresentar rosa pálido, e coradas com azul de metileno diluído (1,4%) por dez segundos (Michalany, 1980). As lamínulas foram montadas em lâminas com Entellan para a observação ao microscópio de luz.

Ficou definido que a melhor concentração de células seria a de $2,5 \times 10^5$ células/ml após 24 horas de cultivo, atingindo-se assim a confluência desejada, ou seja, entre 50 a 70%.

3.5. TESTE DO EFEITO DO SOBRENADANTE DA CULTURA DE *Porphyromonas gingivalis* SOBRE AS MONOCAMADAS CELULARES

Com o objetivo de verificar os possíveis efeitos do sobrenadante da cultura de *Porphyromonas gingivalis* sobre as monocamadas celulares o mesmo foi incubado durante uma hora com as células obtidas conforme descrição anterior. Para tanto, as bactérias crescidas em BHI para *Porphyromonas* por 48 horas a 37°C em anaerobiose foram centrifugadas a 10.000 rpm durante cinco minutos e então 1ml do sobrenadante foi coletado e adicionado às monocamadas celulares durante uma hora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. O resultado foi lido após a fixação e coloração das células, conforme descrito no item anterior.

3.6. TESTE DE ADESÃO DA *Porphyromonas gingivalis* ÀS CÉLULAS KB.

Após o cultivo em BHI, em anaerobiose, por 48 horas, as células de *Porphyromonas gingivalis*, amostra padrão e duas amostras isoladas de pacientes (I-5 e I-10), foram lavadas três vezes com PBS 0,02M, pH 7,4 estéril (10.000 rpm por cinco minutos) e ressuspensas em 1ml do mesmo tampão de maneira a serem ajustadas para uma concentração de aproximadamente 10⁸ células por ml, de acordo com a escala de McFarland. Em seguida essa suspensão foi diluída, em PBS 0,02M, pH 7,4, para a concentração de 10⁷ células por ml.

As monocamadas celulares, crescidas sobre lamínulas em placas de 24 concavidades, obtidas conforme descrição anterior, foram lavadas três vezes com PBS e, em seguida, para a realização do teste, 100µl da suspensão bacteriana foram colocados junto à monocamada celular contendo 900µl de Eagle, sem soro fetal bovino e sem antibióticos (Tokuda *et al.*, 1996).

Foram adicionados aos testes 15µg/ml de estreptomicina, concentração essa subinibitória para esse gênero bacteriano, a fim de favorecer sua adesão às monocamadas (Kopp *et al.*, 1996).

As monocamadas infectadas foram incubadas por uma hora a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida foram então lavadas três vezes com PBS 0,02M, pH 7,4 para a remoção de bactérias não aderidas e as lamínulas foram fixadas com metanol secado (Merk) por dez minutos, lavadas em água destilada por dez minutos e coradas com fucsina de Kinyon por uma hora, em temperatura ambiente. Após lavagem em água de torneira por cinco minutos as lamínulas foram descoradas com álcool-ácido a 2% até o tecido se apresentar rósea pálido. Em seguida as lamínulas foram coradas com azul de metileno a 1,4% por dez segundos.

Após a coloração as lamínulas foram desidratadas com álcoois 70°, 80°, 90° GL e absoluto e montadas em lâminas com Entellan para, em seguida, serem observadas sob microscopia de luz para a verificação da adesão (Tokuda *et al.*, 1996).

A coloração de Kinyon foi utilizada somente para os testes de adesão da amostra padrão ATCC 33277. A adesão das amostras coletadas de pacientes foi

visualizada através de reação de imunoperoxidase, como justificado posteriormente.

Em todos os testes as amostras de *E. coli* K12 com 1% de D-manose, ou O115 como controle negativo foram incluídas.

3.7. TESTES DE INVASÃO DA *Porphyromonas gingivalis* ÀS CÉLULAS KB

As bactérias testadas foram a amostra padrão de *P. gingivalis* ATCC 33277 e duas amostras isoladas de pacientes (I-5 e I-10). As suspensões bacterianas cultivadas por dois dias em caldo BHI em anaerobiose foram lavadas três vezes com PBS, 0,02M pH 7,4 e ressuspensas no mesmo tampão para uma concentração de aproximadamente 10^7 bactérias por ml.

As monocamadas celulares, obtidas após cultivo em meio Eagle em placas de 24 concavidades suplementado com 10% de soro fetal bovino, contendo os antibióticos e incubadas a 37°C por 24 horas sob atmosfera de 5% de CO₂ (Madianos *et al.*, 1996) foram lavadas três vezes com PBS 0,02M, pH 7,4 e inoculadas com 100µl de cada suspensão bacteriana em meio Eagle sem antibióticos ou soro e o sistema foi incubado a 37°C e 5% de CO₂ por uma hora. A seguir as bactérias não aderidas foram removidas com três lavagens com PBS 0,02M pH 7,4. As monocamadas foram então incubadas com 900µl de Eagle contendo 0,1mg/ml de metronidazol por três horas, para eliminar as bactérias

extracelulares, porém aderidas. Após a remoção do antibiótico com três lavagens com o mesmo tampão as lamínulas foram fixadas com metanol anidro e submetidas à reação de imunoperoxidase, segundo o protocolo de Soliman *et al* (1997) com algumas modificações feitas durante a padronização dos testes. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

3.8. REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE

Com o objetivo de melhor observar a adesão e invasão de *Porphyromonas gingivalis* às células epiteliais foram feitas reações de imunoperoxidase utilizando-se como controle negativo a *Escherichia coli* O115 ou K12.

As lamínulas, após testes de adesão e/ou invasão, foram fixadas em metanol secado por dez minutos. A seguir foi aplicada H₂O₂ 3% durante cinco minutos, fazendo-se depois lavagem com PBS-Tween-20 0,1% por cinco minutos, repetindo-se o procedimento por mais dois minutos. O soro anti *Porphyromonas gingivalis* diluído em PBS/T a 1:1500 foi colocado sobre as monocamadas infectadas e as lamínulas foram incubadas em câmara úmida a 4° C por 18 horas. Fez-se nova lavagem com PBS/T por cinco minutos três vezes e incubou-se as células com PBS/T + BSA 2,5% em câmara úmida à temperatura ambiente por uma hora. Após outra lavagem com PBS/T, nas mesmas condições, foi colocado soro anti IgG de coelho, conjugada com peroxidase (obtida comercialmente) diluída a 1:10.000 em PBS/T. Incubou-se em câmara úmida a 37°C por uma hora

e foram feitas mais três lavagens com PBS (cinco minutos). Acrescentou-se diaminobenzidina (DAB) (5mg DAB + 5ml Tris + 5µl de H₂O₂), aguardando-se de cinco a dez minutos para, em seguida, ser feita nova lavagem com PBS 0,02M, pH 7,4. Finalmente a reação foi corada com hematoxilina por três minutos e lavada com PBS por um minuto. As lamínulas foram desidratadas com a série de alcoóis, montadas em lâminas com Entellan e observadas ao microscópio de luz.

3.9. TESTE DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE *Porphyromonas gingivalis* ÀS CÉLULAS KB COM O USO DE SORO HUMANO, SORO FETAL BOVINO E AÇÚCARES

Para se verificar possíveis inibidores da adesão e conseqüente invasão da *Porphyromonas gingivalis* às células epiteliais, foram testados diferentes açúcares, além de soros humanos em "pool" e soro fetal bovino (SFB).

Foram coletados 5ml de sangue de cada estudante voluntário, num total de seis. O sangue foi colocado em banho maria a 37°C por dez minutos e, em seguida, centrifugado a 2000 rpm por mais dez minutos. Os soros foram colocados em "pool" e em seguida submetidos a banho maria a 56°C por 30 minutos.

Os açúcares utilizados (Sigma) foram: D-Manose, D-Manosamina, N-acetil-galactosamina, D-Galactosamina, N-acetil-glucosamina e α-D-fucose. Preparados

em soluções a 0,1M de PBS, os mesmos foram filtrados em membrana Millipore 0,45µm e estocados a -20°C (Okuda *et al.*, 1981).

Para a realização dos testes as células, ou bactérias, foram tratadas previamente com cada tipo de açúcar numa concentração de 0,1 e 0,05 M, diluídos em água destilada e incubados durante uma hora. O mesmo procedimento foi adotado para o soro humano e soro fetal bovino, utilizando concentrações de 1:100 para ambos, diluídos em meio Eagle para o tratamento das células e em PBS 0,02M pH 7,4 no caso do tratamento das bactérias. Após o período de incubação com os soros e com os açúcares, foi feita a inoculação nas células com 10⁷ bactérias por ml de meio, submetendo-se o sistema a agitação durante 15 minutos e incubação por 45 minutos a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida as células foram lavadas três vezes com PBS para a remoção das bactérias não aderidas e submetidas à reação de imunoperoxidase.

3.10. TESTE DE INIBIÇÃO DA AGLUTINAÇÃO DE ERITRÓCITOS DE CARNEIRO POR *Porphyromonas gingivalis* COM AÇÚCARES, SORO HUMANO E SORO FETAL BOVINO

Os açúcares já citados, além de soro humano e soro fetal bovino, foram testados para a verificação de possível capacidade de inibição da aglutinação de

eritrócitos de carneiro. Os eritrócitos foram lavados três vezes em PBS 0,02M, pH 7,4, assim como as bactérias cultivadas em caldo BHI.

Os açúcares foram testados nas concentrações de 0,1 e 0,05M, diluídos no mesmo tampão, e os soros diluídos na razão 2 até 1:256, também em PBS. 25µl de cada açúcar nas concentrações indicadas foram colocados em placas de 96 concavidades para reagir com 25µl de hemácias a 1% ou suspensão bacteriana (aproximadamente 10^8 células/ml). O mesmo foi feito com os soros. Após uma hora de incubação foram acrescentados 50µl de suspensão bacteriana ou hemácia. Depois de leve agitação, a placa foi incubada por três horas à temperatura ambiente, para em seguida proceder-se a leitura visual.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DOS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO DE *P. gingivalis*

Foram coletadas amostras de bolsas periodontais, com no mínimo 5 mm de profundidade de seis pacientes, sendo duas bolsas por paciente.

Após o período de cultivo inicial em anaerobiose a jarra foi aberta e das doze placas semeadas foram selecionadas as colônias escuras (marrom a negro), pequenas a médias, convexas e completamente delimitadas, num total de quinze, as quais foram novamente semeadas para o seu reisolamento. A Figura 1 mostra o crescimento característico da *P. gingivalis* em ágar sangue contendo hemina.

Essas colônias indicativas para *Porphyromonas* foram submetidas à coloração de Gram para a observação das características típicas das bactérias, como seu tamanho, forma e tipo de coloração adquirida durante o processo. Das amostras testadas oito delas se apresentaram como bacilos curtos e gram negativos, sem contaminação por outros microrganismos (dados não demonstrados).

As colônias selecionadas com as características morfológicas de *Porphyromonas* foram semeadas em ágar sangue e incubadas simultaneamente em aerobiose e anaerobiose. Nenhuma delas cresceu sob aerobiose.

Após a observação em ágar sangue quanto às características da colônia, produção de pigmento escuro, coloração de Gram e respiração anaeróbia, as

amostras foram cultivadas em ágar Columbia para a realização do teste da catalase. Nenhuma das amostras isoladas produziu a enzima, confirmando o tipo de respiração que praticam. A amostra de *S. aureus*, bactéria aeróbia que foi utilizada como controle positivo, apresentou resultado positivo para esse teste.

Para distinguir a *Porphyromonas gingivalis* das outras *Porphyromonas* foi feito o teste da aglutinação de eritrócitos de carneiro. A amostra negativa de *E. coli* foi testada juntamente com as outras amostras e apresentou resultado negativo. O título da hemaglutinação para a amostra padrão foi de 1:16 enquanto das oito amostras testadas, quatro apresentaram título baixo (1:2) e outras quatro amostras (I-5, I-5M, I-10 e I-14) coletadas de pacientes, tiveram título de 1:8 e foram selecionadas para os testes de adesão e invasão em células. Porém, antes dos testes com células, o teste confirmatório do PCR para a detecção da fímbria de *P. gingivalis* foi feito. Dessas quatro amostras selecionadas, como indicativas para *Porphyromonas gingivalis*, três delas (I-10, I-5 e I-5M) apresentaram resultado positivo no teste do PCR, com a banda de aproximadamente 132 pb, obtida com o cálculo da regressão linear, relativa à fímbria, detectável pelos iniciadores utilizados. Uma delas (I-14) não apresentou a seqüência gênica. A amostra controle negativo foi a *Escherichia coli* K12, que também não apresentou a mesma seqüência, enquanto a amostra padrão ATCC 33277 demonstrou também a presença da seqüência analisada. O resultado do PCR está demonstrado na Figura 2.

4.2. RESULTADOS DOS TESTES DE ADESÃO E INVASÃO DE *P. gingivalis* EM MONOCAMADAS CELULARES

Após a incubação durante uma hora em atmosfera contendo 5% de CO₂ com o sobrenadante da cultura bacteriana de *Porphyromonas gingivalis*, as monocamadas celulares foram lavadas três vezes com PBS, fixadas com metanol secado e submetidas à coloração de Kinyon (Michalany, 1980). Desidratadas com álcool, as lamínulas foram montadas em lâminas com Entellan e observadas ao microscópio de luz. As células foram totalmente destruídas pelo sobrenadante da cultura de *Porphyromonas gingivalis*, fato observado pela ausência total de células nas lamínulas (dados não demonstrados).

Após o cultivo das células KB em meio Eagle com 10% de soro fetal bovino, a monocamada celular foi tripsinizada e ajustada para diferentes concentrações e tempos de cultivo, buscando o melhor resultado para a obtenção de células viáveis para a infecção. As células foram lavadas com PBS e fixadas em metanol anidro após 2, 4, 24 e 48 horas, com concentrações de $4,5 \times 10^6$ e $2,5 \times 10^5$ células por ml. Na concentração de $2,5 \times 10^5$, com tempo de cultivo de 24 horas, as células apresentaram morfologia mais conservada, contorno definido da membrana celular e citoplasma conservado, mais apropriado para a adesão bacteriana, além de uma confluência entre 50 a 70%, o que era desejado.

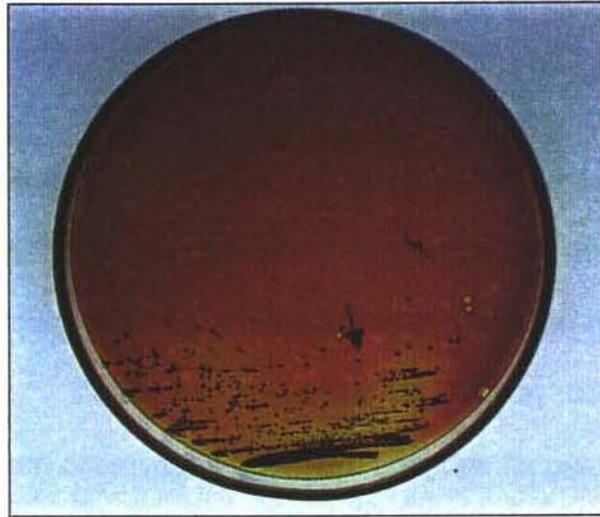


Figura 1: Placa de ágar sangue contendo hemina, com colônias pequenas, convexas, delimitadas e pigmentadas de negro, características de *P. gingivalis*

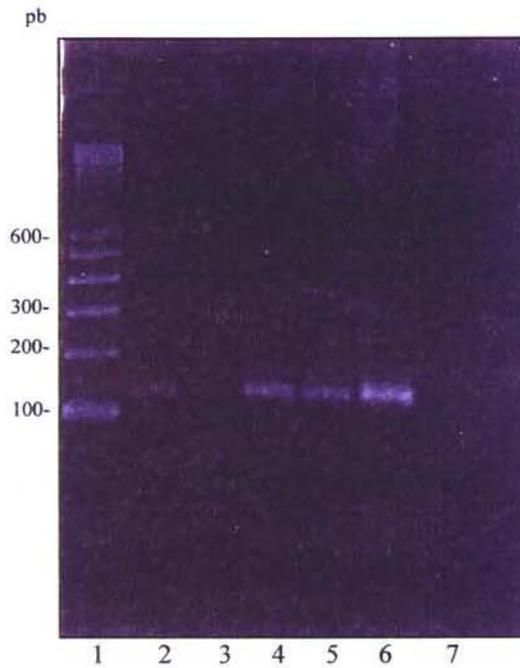


Figura 2: Resultado do teste de PCR para detecção da fímbria de *Porphyromonas gingivalis*. Coluna 1: marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder). Coluna 2: Amostra padrão de *P. gingivalis* ATCC33277. Coluna 3: *Escherichia coli* K12 C600. Colunas 4, 5 e 6: Amostras de *P. gingivalis* I-10, I-5 e I-5M. Coluna 7: Amostra de *P. gingivalis* I-14.

As amostras padrão, I-10, I-5 e *E. coli* foram incubadas com as células durante uma hora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, seguindo-se lavagem com PBS, fixação com metanol secado e coloração de Kinyon ou reação de imunoperoxidase. Tanto na coloração de Kinyon como na reação de imunoperoxidase foram observadas bactérias aderidas às células, distribuídas em vários pontos. Porém, quando a técnica de imunoperoxidase foi utilizada, pôde-se observar com maior nitidez essa adesão, devido ao melhor contraste que essa técnica fornece. A Figura 3 mostra a adesão da amostra padrão visualizada através da coloração de Kinyon, enquanto que a Figura 4 mostra a adesão da amostra padrão e a Figura 5 das amostras I-5 e I-10, respectivamente, após a reação de imunoperoxidase. Quando foi acrescentada a estreptomicina para a verificação do aumento ou não da adesão, não foi observada ao microscópio de luz qualquer alteração, porém não foi feito nenhum tipo de contagem da adesão.

Para os testes de invasão, seguindo o período de incubação por uma hora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril e incubadas por mais três horas com Eagle contendo 0,1 mg/ml de metronidazol. A monocamada celular foi então lavada novamente com PBS estéril mais três vezes para a remoção do antibiótico. As lamínulas foram fixadas com metanol secado por dez minutos e submetidas à coloração de Kinyon e reação de imunoperoxidase. Por ser uma bactéria de tamanho muito reduzido, não foi possível observar se as células realmente sofreram invasão pelo microrganismo quando a reação foi corada pelo método de Kinyon. Somente através da imunoperoxidase pôde-se observar bactérias internalizadas, como

mostrado nas Figuras 6 e 7. Tanto a amostra padrão quanto as amostras I-5 e I-10 apresentaram resultados semelhantes em todos os testes e a amostra utilizada como controle negativo, a *E. coli*, não reagiu com as monocamadas celulares.

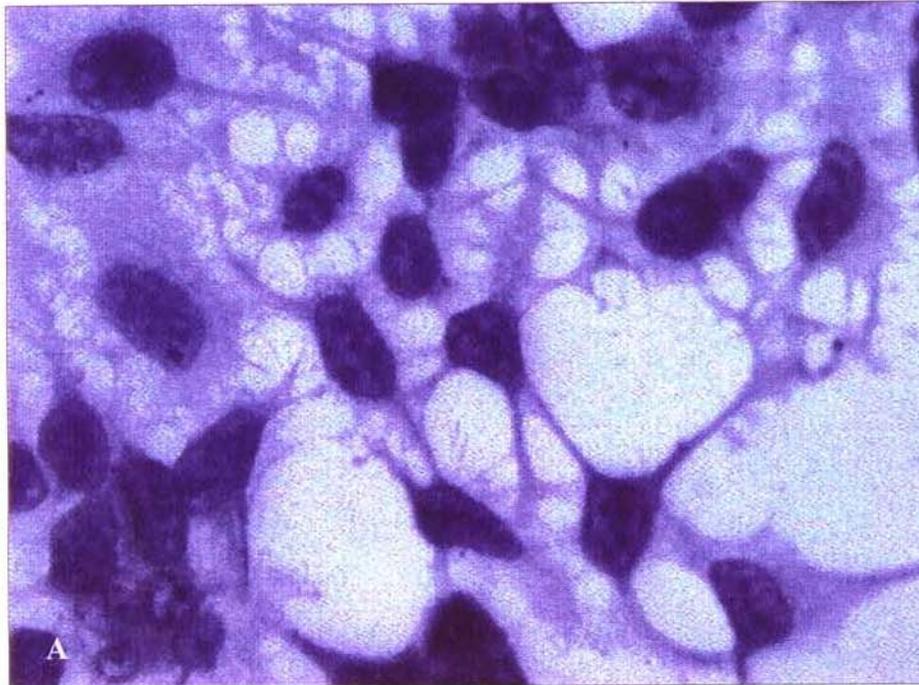


Fig. 3: Testes de adesão de *P. gingivalis* às células KB: A) Monocamada de células KB não infectada. Aumento: 400x antes de 27% de redução da imagem digitalizada; B) *P. gingivalis* ATCC 33277, visualizada através da coloração de Kinyon. Aumento: 1000x antes de 27% de redução da imagem digitalizada.

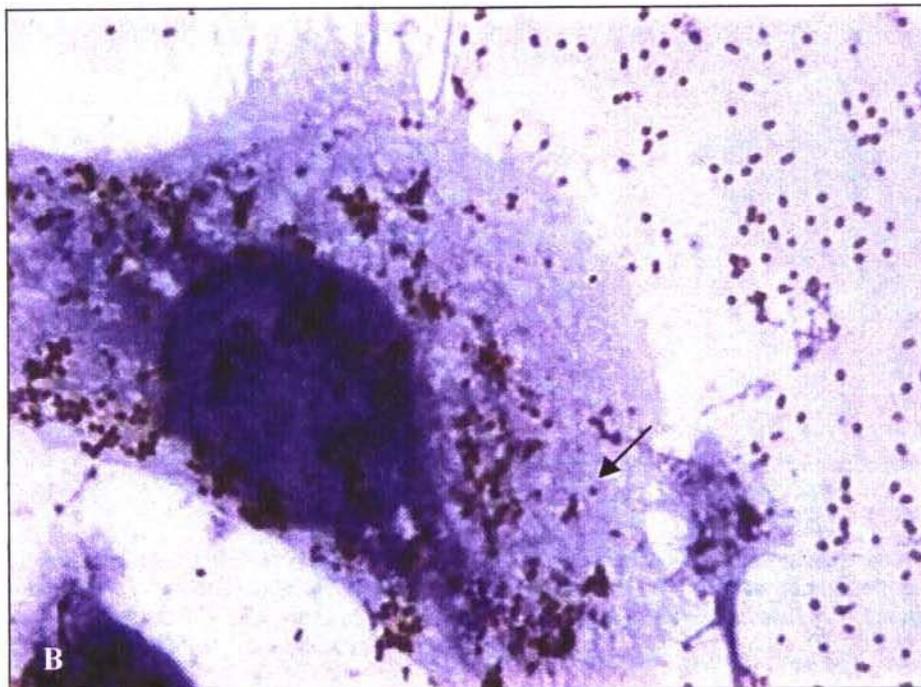
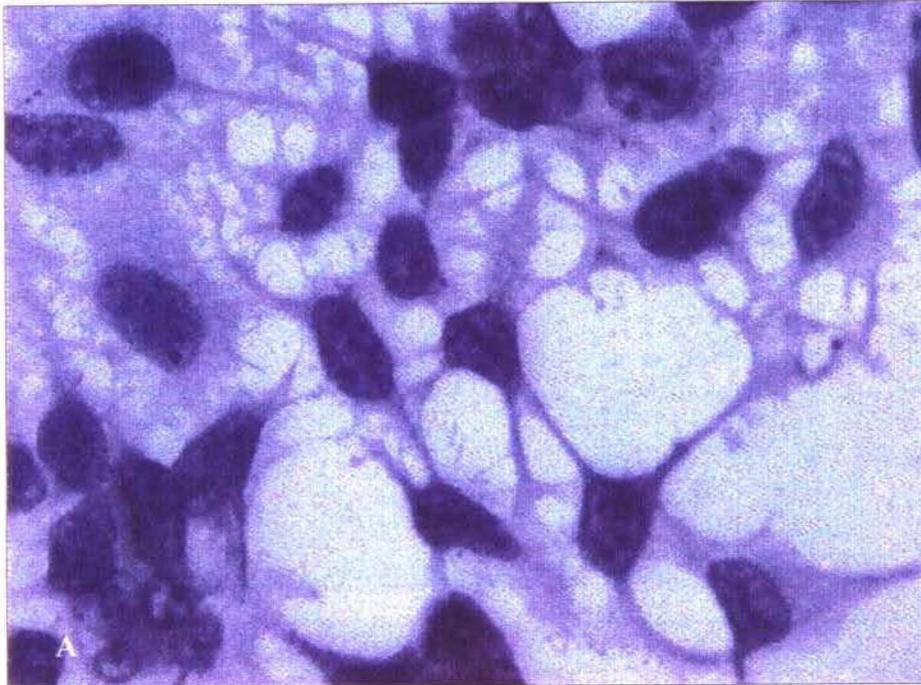


Fig. 4: Testes de adesão de *P. gingivalis* às células KB: A) monocamada de células KB não infectada. Aumento 400x antes de 27% de redução da imagem digitalizada; B) *P. gingivalis* ATCC 33277 visualizada através da reação imunoperoxidase. Aumento: 1000x antes de 31% de redução da imagem digitalizada

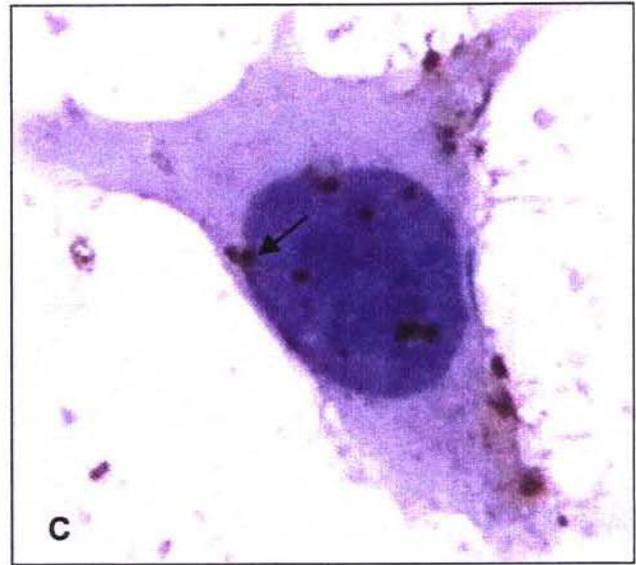
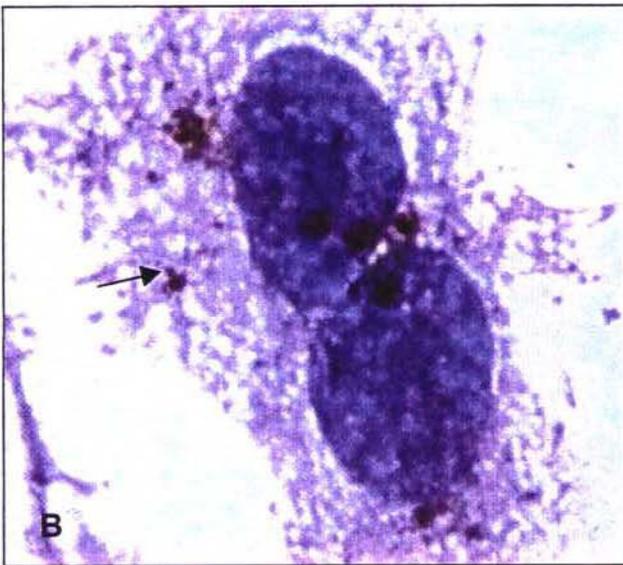
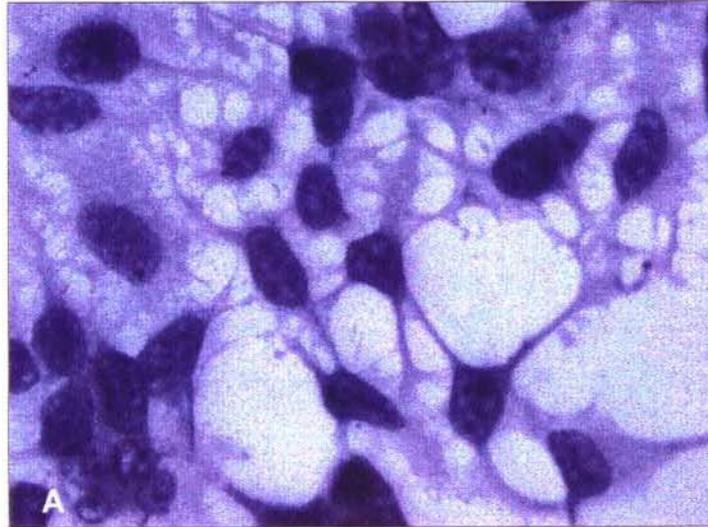


Fig. 5: Testes de adesão de *P. gingivalis* às células KB visualizada através da reação de imunoperoxidase. A) Monocamada de células KB não infectada. Aumento: 400x antes de 44% de redução da imagem digitalizada; B) *P. gingivalis* amostra I-10. Aumento: 1000x antes de 25% de redução da imagem digitalizada; C) *P. gingivalis* amostra I-5. Aumento: 1000x antes de 34% de redução da imagem digitalizada

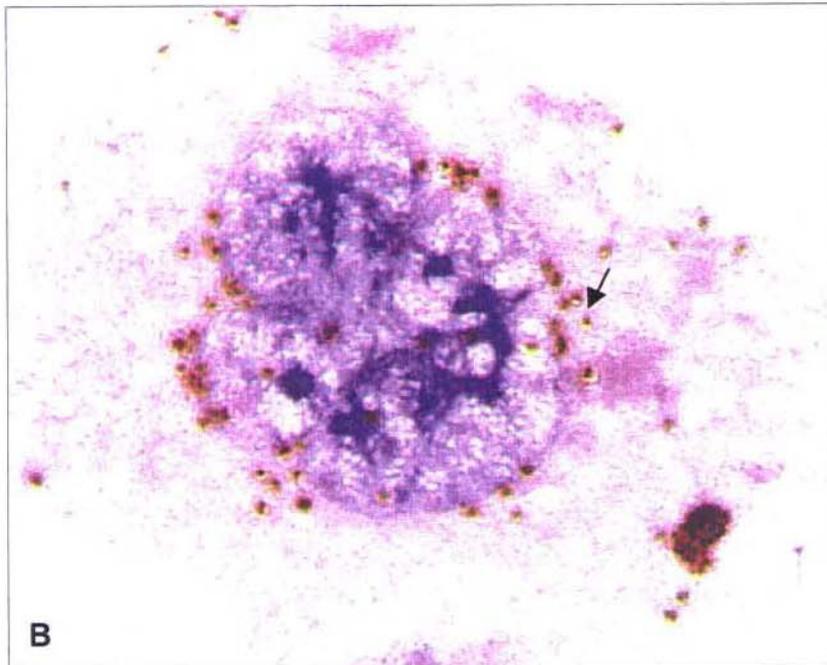
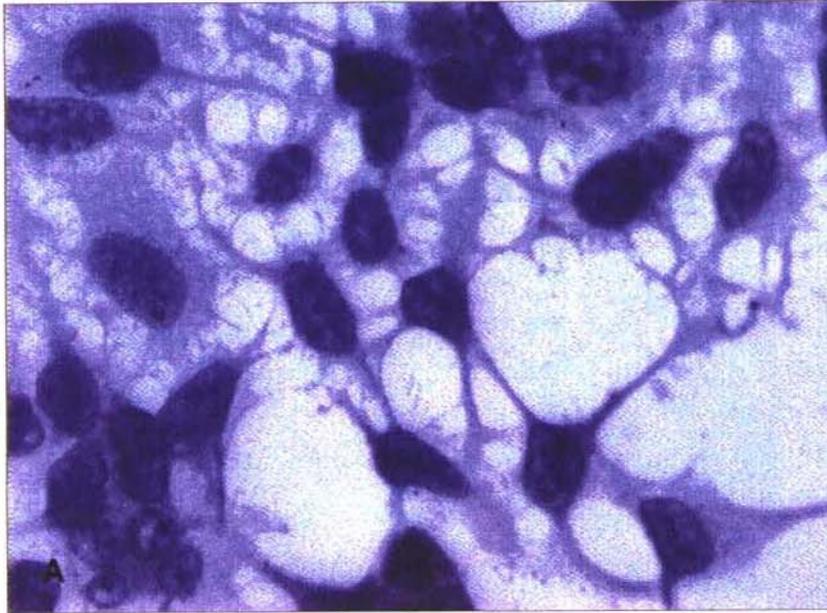


Figura 6: Teste de invasão de *Porphyromonas gingivalis* às células KB visualizado através de reação de imunoperoxidase. A) Monocamada de células KB não infectada. Aumento: 400x antes de 35% de redução da imagem digitalizada; B) *P. gingivalis* ATCC 33277. Aumento: 1000x antes de 32% de redução da imagem digitalizada.

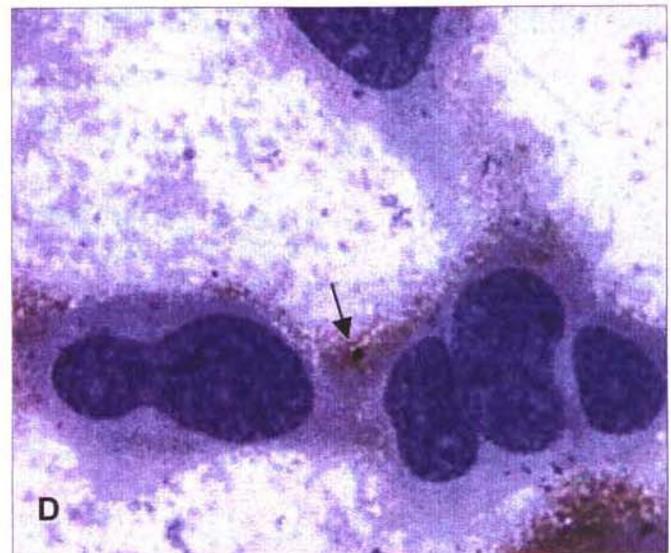
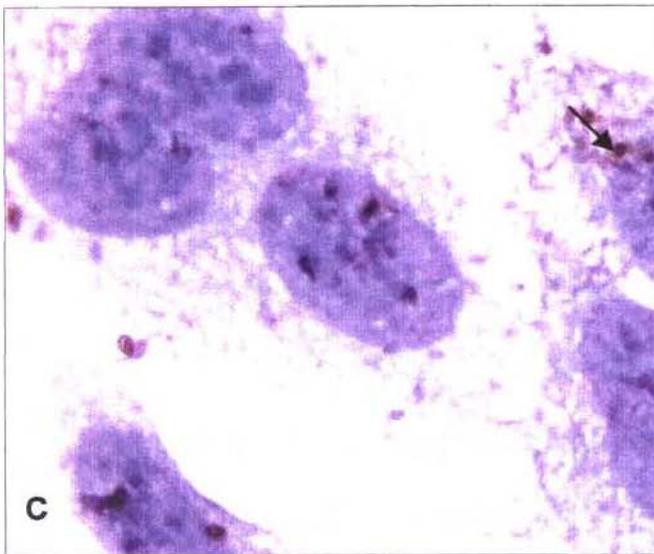
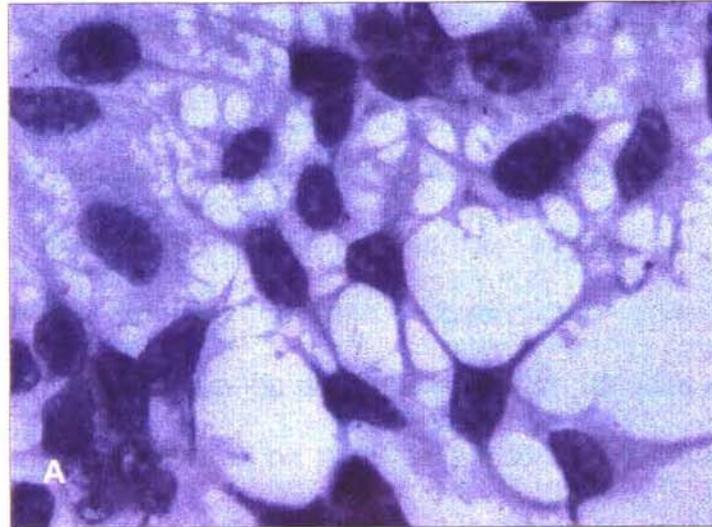


Figura 7. Teste de invasão de *P. gingivalis* às células KB visualizado através de reação de imunoperoxidase. A) Monocamada de células KB não infectada. Aumento: 400x antes de 44% de redução da imagem digitalizada; B) *P. gingivalis* I-5. Aumento: 1000x antes de 30% de redução da imagem digitalizada; C) *P. gingivalis* I-10. Aumento: 1000x antes de 40% de redução da imagem digitalizada

Após o pré-tratamento das células e das bactérias com soro humano, soro fetal bovino e açúcares, foram feitos os testes de adesão de *Porphyromonas gingivalis* amostra padrão, I-5 e I-10, além da *E. coli*, às células. Quando as células foram tratadas com soro, houve inibição da adesão da *P. gingivalis* e, conseqüentemente, da sua invasão, observadas após a reação de imunoperoxidase. Porém, quando as bactérias foram tratadas com os possíveis inibidores, não houve mudança no perfil de adesão ou invasão. Também não houve inibição da adesão com os açúcares testados, tanto no tratamento das células como das bactérias. A amostra de *E. coli* não aderiu em nenhum dos testes com as células, com o uso ou não dos inibidores utilizados. As amostras I-5 e I-10 seguiram o mesmo padrão da amostra ATCC 33277, com inibição da adesão e invasão quando as células foram tratadas com soros e sem alterações quando as amostras foram tratadas com os soros ou quando os açúcares foram testados.

O resultado do teste de inibição da adesão de *P. gingivalis* com o tratamento das células com soro ou açúcares está ilustrado nas Figuras 8, 9 e 10. O teste de aglutinação de eritrócitos de carneiro foi inibido com o pré-tratamento das hemácias com soro humano e soro fetal bovino, sendo o título 1:128.

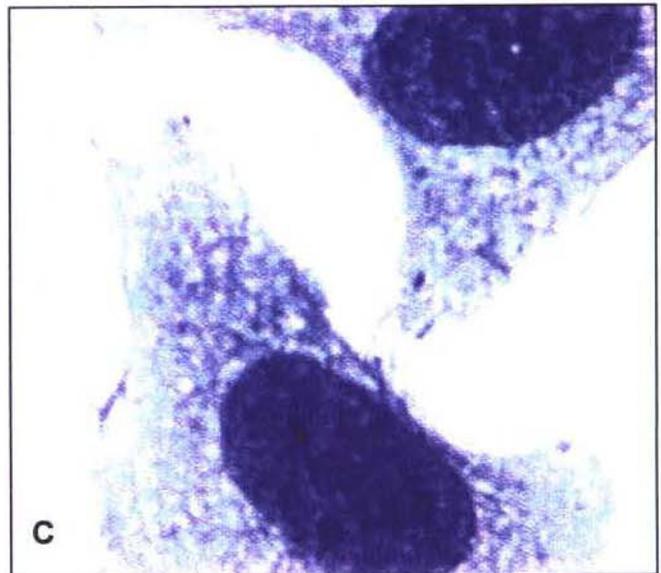
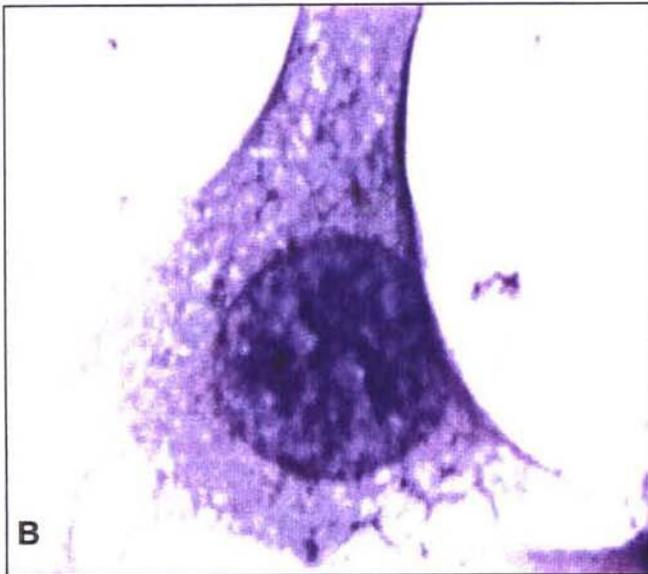
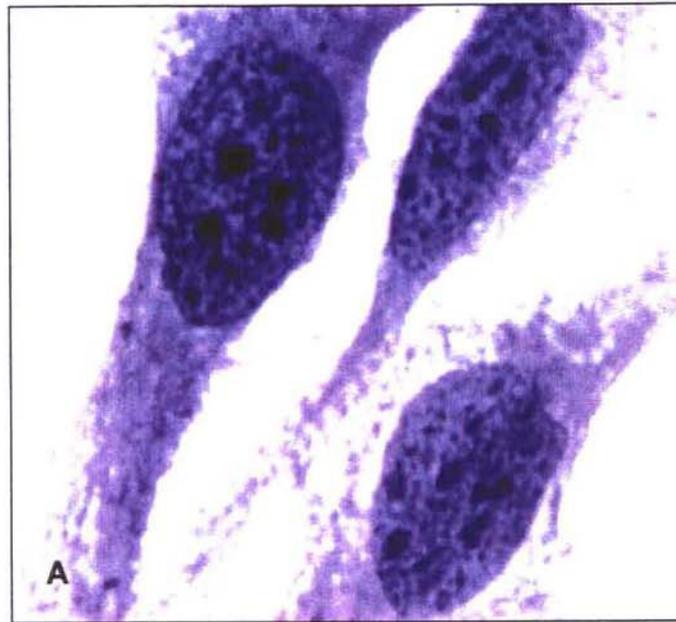


Figura 8. Testes de inibição da adesão de *P. gingivalis* às células KB através do pré-tratamento das células, ou das bactérias, com soro humano, soro fetal bovino e açúcares. A) Monocamada de células KB não infectada. Aumento: 1000x antes de 33% de redução da imagem digitalizada; B) Monocamada de células KB tratadas com soro humano e inoculadas com *P. gingivalis*. Aumento: 1000x antes de 32% de redução da imagem digitalizada. C) Monocamada de células KB tratadas com soro fetal bovino e inoculadas com *P. gingivalis*. Aumento: 1000x antes de 25% de redução da imagem digitalizada.

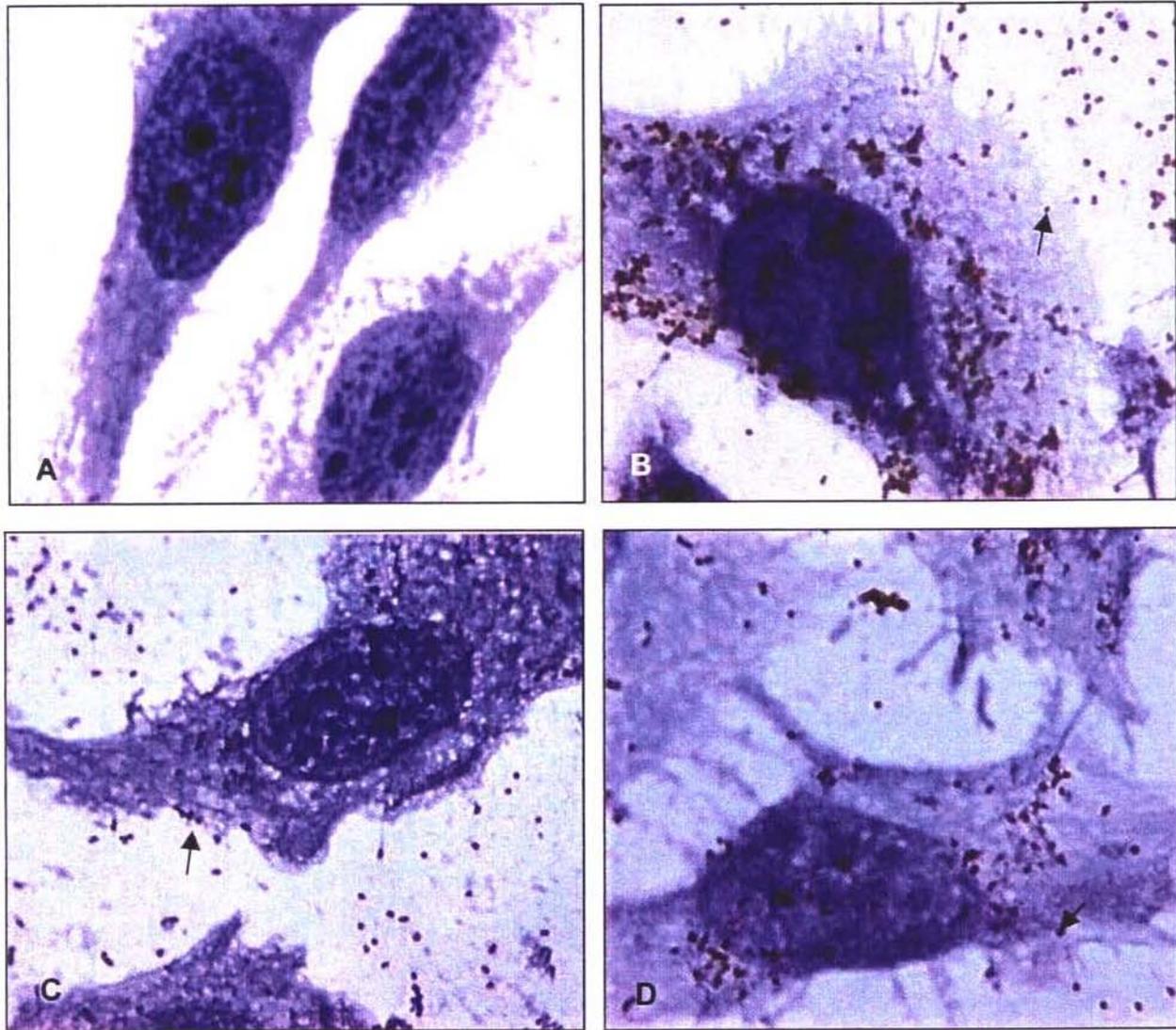


Figura 9: Testes de inibição da adesão de *Porphyromonas gingivalis* às células KB através do pré-tratamento das células, ou das bactérias, com soro humano, soro fetal bovino e açúcares. A) Monocamada de células KB não infectada. Aumento: 1000x antes de 41% de redução da imagem digitalizada; B) *P. gingivalis* ATCC33277 tratada com soro humano e inoculada na monocamada de células KB. Aumento: 1000x antes de 40% de redução da imagem digitalizada; C) *P. gingivalis* ATCC 33277 tratada com soro fetal bovino e inoculada na monocamada de células KB. Aumento: 1000x antes de 45% de redução da imagem digitalizada; D) Monocamada de células KB tratada com D-manose e inoculada com *P. gingivalis* ATCC33277. Aumento: 1000x antes de 38% de redução da imagem digitalizada.

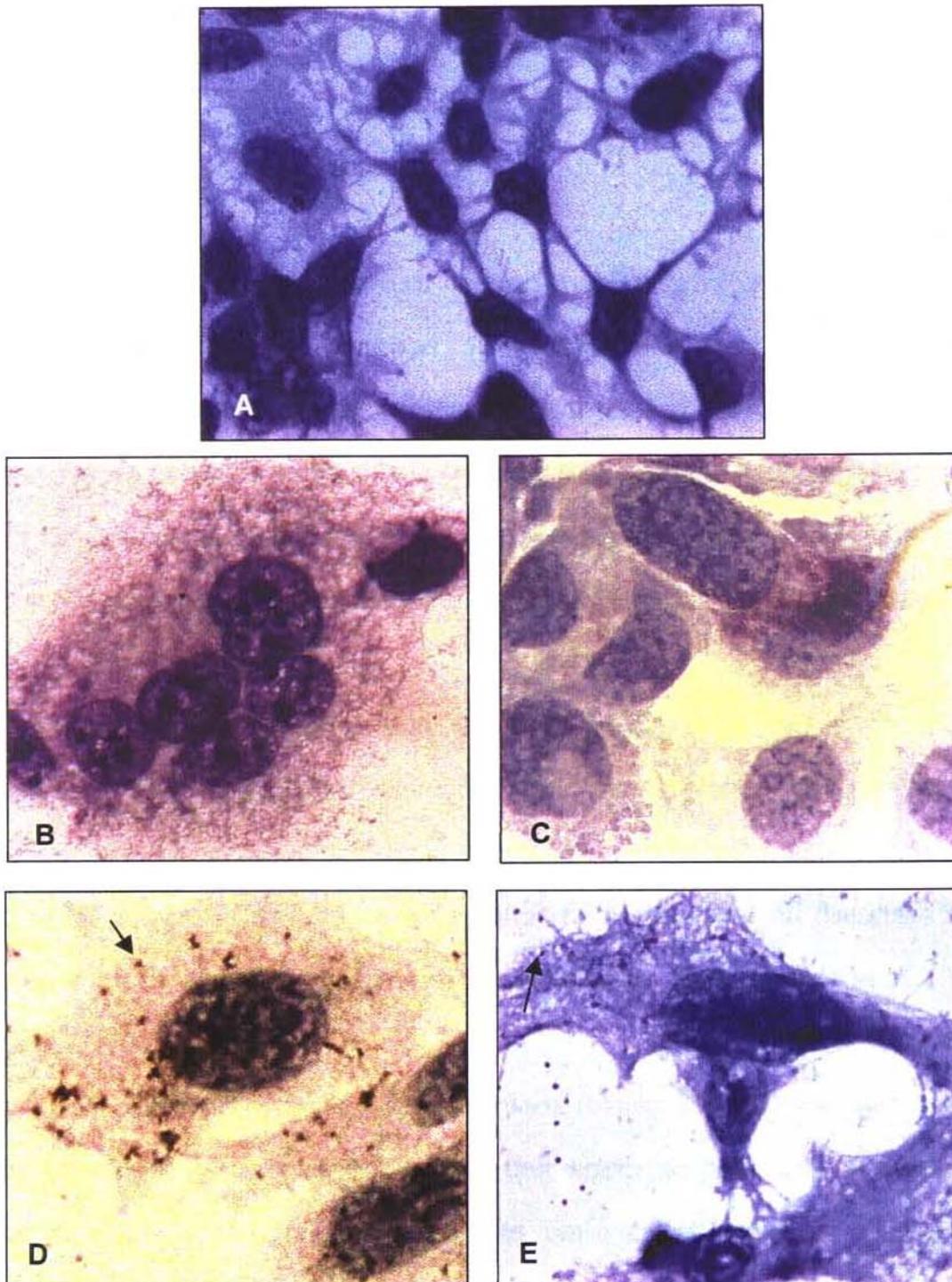


Figura 10. Testes de inibição da adesão de *Porphyromonas gingivalis* às células KB através do pré-tratamento das células, ou das bactérias com soro humano, soro fetal bovino e açúcares. A) monocamada de células KB não infectada. Aumento: 400x antes de 41% de redução da imagem digitalizada. B) Monocamada de células KB tratada com soro humano e inoculada com *P. gingivalis* I-10. Aumento: 1000x antes de 54% de redução da imagem digitalizada; C) Monocamada de células KB tratada com soro humano e inoculada com *P. gingivalis* I-5. Aumento: 1000x antes de 54% de redução da imagem digitalizada; D) *P. gingivalis* I-10 tratada com soro humano e inoculada na monocamada de células KB. Aumento: 1000x antes de 51% de redução da imagem digitalizada; E) *P. gingivalis* I-5 tratada com soro humano e inoculada na monocamada de células KB. Aumento: 1000x antes de 49% de redução da imagem digitalizada.

5. DISCUSSÃO

Vários relatos na literatura demonstram a etiologia bacteriana na periodontite (Lamont and Jenkinson, 1998; Socransky *et al.*, 1998; Theilade, 1986). Apesar da microbiota altamente diversificada da cavidade oral, há diferenças de espécies bacterianas nos sítios com saúde periodontal e naqueles com características de periodontite, que apresentam um aumento para uma população gram negativa (Fletcher *et al.*, 1995; Griffen *et al.*, 1998; McGraw *et al.*, 1999).

Para que um microrganismo endógeno possa vir a causar danos ao hospedeiro são necessárias alterações no microambiente, decorrentes de modificações na população da própria microbiota, como também na expressão de fatores de virulência bacterianos, associando-se a alterações ou distúrbios nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Fletcher *et al.*, 1995; Fravalo *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1995).

A *P. gingivalis* é dotada de numerosos fatores de virulência que podem estar envolvidos na colonização, invasão dos tecidos do hospedeiro e evasão à resposta imune do mesmo sendo, portanto, um possível agente da periodontite (Deshpande *et al.*, 1998; Fletcher *et al.*, 1995; Fravalo *et al.*, 1996; Kaminishi *et al.*, 1993).

Evidências têm sido acumuladas que *P. gingivalis* é membro da microbiota comensal da cavidade oral, sugerindo que seu papel na periodontite é altamente oportunista, não necessariamente enfraquecendo a evidência de uma contribuição decisiva desse patógeno nas desordens periodontais. Entretanto, para ter um

papel em uma infecção multifatorial e polimicrobiana, a *P. gingivalis* deve demonstrar propriedades específicas permitindo uma mudança de ação de comensal para patogênica. Dessa maneira, essas propriedades podem implicar em interações moleculares entre *P. gingivalis* e um alvo chave no periodonto, a célula epitelial gengival (Fravallo *et al.*, 1996). Segundo alguns autores, a *P. gingivalis*, uma bactéria gram negativa, freqüentemente isolada da cavidade oral (Griffen *et al.*, 1998) estaria também associada à periodontite (Griffen *et al.*, 1998; Lamont *et al.*, 1992; Weinberg *et al.*, 1997) tanto por sua capacidade de aderir e colonizar os tecidos como por lançar mão de mecanismos de evasão às defesas do hospedeiro (Griffen *et al.*, 1998; McGraw *et al.*, 1999).

Sua capacidade de adesão, e conseqüente colonização, estaria relacionada à sua habilidade em induzir a formação de fímbrias (Amano *et al.*, 1996) e há também estudos demonstrando que componentes da membrana externa fariam ligações com células endoteliais (Deshpande *et al.*, 1998). A partir dessa colonização haveria a possibilidade da bactéria invadir o tecido, protegendo-se assim de alguns fatores de defesa do hospedeiro e permitindo sua disseminação, que seria inclusive, facilitada pela produção de enzimas como as proteases (Ciborowski *et al.*, 1994).

Sendo assim, buscar metodologias que permitam o rápido isolamento e identificação desse patógeno, bem como buscar entender seus processos de adesão, podem vir a colaborar no sentido de diminuir sua incidência relativa aos casos de periodontite.

Segundo Hunt *et al* (1986), as colônias de *P. gingivalis* e *P. asaccharolyticus* são muito similares e um meio seletivo com ácido nalidíxico,

sulfato de colistina e bacitracina torna-se necessário para o isolamento de *P. gingivalis* bem como sua distinção das outras *Porphyromonas*. O ágar sangue contendo esses antibióticos é normalmente usado para o isolamento seletivo de bactérias gram positivas em populações mistas pela inibição de certas bactérias gram negativas aeróbias e anaeróbias facultativas, mas não inibem o crescimento de algumas espécies de *Bacteroides*. Dentre os organismos que crescem no ágar sangue seletivo a *P. gingivalis* pode ser facilmente distinguida pelas características da colônia, cujo diâmetro fica em torno de 1mm e apresenta-se com coloração escura. Por outro lado, o crescimento deste patógeno pode ser inibido por diversas espécies da placa dental subgengival como actinobacilos, capnocitofaga, hemófilos, estreptococos, fusobactérias e outras, na ausência de um meio contendo antibióticos específicos contra estas (Hunt *et al.*, 1986).

No presente trabalho, os cones de papel absorvente utilizados para coletar material da bolsa periodontal com profundidade de no mínimo 5 mm foram semeados em ágar sangue contendo antibióticos (bacitracina, ácido nalidíxico e sulfato de colistina). Após o isolamento é necessária a utilização de testes visando a identificação do gênero *Porphyromonas* e sua diferenciação para a espécie *gingivalis*. No presente trabalho os testes escolhidos levaram à identificação de pelo menos quatro amostras, baseando-se nos testes de Gram, respiração aeróbia/anaeróbia, catalase e aglutinação com eritrócitos de carneiro (Moncla *et al.*, 1994; Lamont and Jenkinson, 1998).

Segundo Okuda *et al* (1981) as fímbrias extraídas de *P. gingivalis* apresentaram forte capacidade hemaglutinante a dezesseis tipos de eritrócitos, enquanto que amostras de *P. asaccharolytica* não apresentaram nenhuma

aglutinação forte aos eritrócitos testados, inclusive de carneiro, mostrando então uma clara diferença no padrão de hemaglutinação entre as duas *Porphyromonas*, confirmando ser este um bom método para a diferenciação das duas espécies. Ainda segundo esses autores, a atividade de hemaglutinação da *P. gingivalis* não foi afetada pela adição de nenhum de quinze açúcares testados, concordando com os resultados encontrados neste trabalho, onde sete tipos de açúcares coincidentes com aqueles de Okuda *et al* (1981), com exceção da D-manosamina, também não foram capazes de inibir esta atividade.

Sob condições normais de crescimento a *P. gingivalis* expressa altos níveis de fímbria, provendo uma ótima oportunidade de aderir e invadir as células epiteliais da gengiva e também para sua ligação aos microrganismos antecedentes da placa pré formada. Secreções orais como o fluxo salivar e o fluido gengival ajudam a proteger o hospedeiro. Após a colonização inicial a bactéria pode multiplicar e invadir as células epiteliais, contribuindo para a progressão da doença (Xie *et al.*, 1997). As fímbrias são largamente distribuídas entre as linhagens de *P. gingivalis*, como revelado por estudos morfológicos e imunquímicos e possuem epítomos espécie-específicos (Ogawa *et al.*, 1991).

Apesar da utilização de metodologia visando o aumento na produção de fímbria pelas amostras de *Porphyromonas*, isto é, o cultivo por sete dias em ágar Columbia contendo hemina, verificou-se, dentre as oito amostras analisadas, títulos muito baixos no teste de hemaglutinação. Quatro amostras com título 1:8 foram então selecionadas para o teste de PCR, visando a identificação de amostras de *Porphyromonas gingivalis* portadoras do gene que codifica para uma das fímbrias testado por Riggio *et al* (1996) e Watanabe *et al* (1993), para futuros

testes de adesão e sua possível inibição.

Das quatro amostras analisadas, três delas (I-10, I-5 e I-5M) apresentaram resultados positivos para a presença da seqüência genômica, comparada à amostra padrão ATCC 33277. A amostra I-14, positiva em todos os testes anteriores para *P. gingivalis*, não apresentou essa seqüência. As fímbrias, tendo um papel tão importante nos processos de colonização e desenvolvimento da doença, além das interações com as células epiteliais, são objeto de muitas pesquisas. Novos iniciadores que detectam a presença de seqüências gênicas específicos para *P. gingivalis* são desenvolvidos para a sua identificação. Recentes estudos (Amano *et al.*, 1999) utilizaram outros iniciadores para amplificar quatro tipos de fímbria da *P. gingivalis*. A amostra I-14, que não reagiu com os iniciadores adotados pode ter outro tipo de fímbria que amplifique com outros iniciadores.

O padrão de adesão das bactérias pode ser investigado fazendo-se relações entre as fímbrias e sua capacidade de aderir aos diversos sítios permissivos encontrados na cavidade oral. Um tipo de fímbria pode dar à bactéria vantagens em determinadas situações, permitindo sua sobrevivência onde bactérias que não a expressam ficariam em desvantagem.

As interações entre patógenos periodontais, como *P. gingivalis* e células epiteliais da gengiva são importantes na colonização do sulco gengival e bolsa periodontal (Lamont *et al.*, 1992). A colonização bacteriana do tecido gengival e sua penetração e destruição são importantes na patogênese da doença periodontal (Duncan *et al.*, 1993) e a aderência bacteriana é considerada como um importante fator para a manutenção da bactéria na superfície mucosa do

hospedeiro (Scaletsky *et al.*, 1984).

P. gingivalis se liga a uma variedade de substratos do hospedeiro tanto inertes, como a hidroxiapatita coberta com saliva, como em células eucarióticas como as células epiteliais gengivais normais ou transformadas. Além disso, essa bactéria liga-se às bactérias orais antecedentes como *Streptococcus gordonii* e *Actinomyces viscosus*. Dentro de todas essas interações, as fímbrias de *P. gingivalis* têm sido identificadas como importantes mediadores. Entretanto, não são consideradas mediadores exclusivos da adesão, sem a qual a respectiva interação não ocorreria (Weinberg *et al.*, 1997).

A *P. gingivalis* pode inicialmente colonizar a margem gengival por se ligar diretamente à camada de saliva sobre o dente, por agregação com outras bactérias gram positivas que colonizam primeiro a margem gengival, ligando-se ao colágeno tipo I, que é a estrutura de suporte primária do dente, interagindo com os componentes da matriz extracelular ou por ligar-se diretamente às células epiteliais que limitam a margem gengival. A inflamação induzida pela colonização primária por bactérias gram positivas pode expor o colágeno tipo I e proteínas da matriz extracelular para a interação com *P. gingivalis*. Entretanto, não está totalmente claro se a interação direta com a película do dente é importante para a incorporação de *P. gingivalis* na placa subgengival.

A amostra padrão e duas amostras isoladas no presente trabalho de bolsas periodontais (I-5 e I-10) foram testadas em monocamadas de células KB e, através de reação de imunoperoxidase, ficou mostrado que as amostras têm a habilidade de se ligar às células epiteliais orais. As bactérias foram observadas aderidas de maneira difusa por toda a superfície celular (Figura 5), padrão este

semelhante ao observado para a amostra padrão (Figura 4) e não observado para as amostras de *E. coli* O115 ou K12 tratada com D-manose. Em testes iniciais, utilizando-se a coloração com fucsina de Kinyon (Michalany, 1980) ficou evidente a dificuldade de visualização das células de *P. gingivalis* e sua adesão às monocamadas celulares. Com a introdução do teste de imunoperoxidase esta dificuldade foi superada. Por ser a *P. gingivalis* uma bactéria de tamanho muito reduzido a reação de imunoperoxidase permite uma melhor visualização de suas interações com as células, quando comparada aos métodos de coloração tradicionais como a coloração de Kinyon, utilizada neste trabalho. O contraste fornecido pela reação de imunoperoxidase permite a diferenciação entre o patógeno e pigmentos do corante ou de próprios restos celulares que podem ser confundidos com a bactéria quando se utiliza colorações comuns.

Kopp *et al.*, em 1996, verificaram que a estreptomicina, em concentração subinibitória (15µg/ml), aumentava a aderência de *Bacteroides melaninogenicus*, bactérias associadas com infecções orais em bovinos. O trabalho foi feito em células epiteliais dos mesmos. Com base nesse resultado, a utilização da estreptomicina na mesma concentração foi testada para se verificar se a mesma aumentaria a adesão de *P. gingivalis*. Apesar de não ter sido feito nenhum tipo de contagem da adesão bacteriana, a observação ao microscópio de luz não mostrou diferença no padrão de adesão.

As interações entre bactéria e células epiteliais que resultam na internalização bacteriana às vezes envolvem indução por sinalização eucariótica, eventualmente produzindo invaginações de membrana que engolfam a bactéria,

processo esse chamado fagocitose (Lamont *et al.*, 1995). O termo invasão é usado para denotar um processo ativo iniciado pela bactéria, resultando na sua entrada na célula. Evidências na literatura sugerem que células epiteliais gengivais e intestinais são capazes de fagocitose, entretanto essa propriedade é provavelmente restrita às células epiteliais que migram e se dividem ativamente, sendo mais provável não ser expressa nas camadas superficiais de células epiteliais já diferenciadas. A medida da adesão de *P. gingivalis* às células epiteliais é complicada pela tendência de certas linhagens em se auto agregarem. A habilidade de um microrganismo de romper as barreiras das células epiteliais é bem estabelecido para certos patógenos como mecanismo de virulência associado. É de particular interesse a habilidade de um patógeno de se multiplicar intracelularmente e invadir células epiteliais adjacentes, sendo minimamente exposto ao meio ambiente extracelular. Essa estratégia rende-lhe inacessibilidade por parte dos anticorpos, fagócitos e antibióticos durante seu curso proliferativo no interior dos tecidos subjacentes (Sandros *et al.*, 1994). Uma localização intracelular pode proteger a bactéria do sistema imune, permitindo a replicação em um meio ambiente rico nutricionalmente e pode facilitar a disseminação da bactéria entre as células ou a destruição das células epiteliais (Lamont *et al.*, 1995; Lamont *et al.*, 1992).

O papel da invasão bacteriana na doença periodontal começou a ser investigado recentemente. Muitas das manifestações clínicas da doença periodontal são crônicas e episódicas, características que podem ser explicadas pelo menos parcialmente pela invasão bacteriana. Estudos demonstraram que *P. gingivalis* pode invadir, além de células epiteliais KB e FGH, culturas primárias de

células epiteliais gengivais humanas e multicamadas de células de bolsa epitelial humana em cultura e também células endoteliais do coração e da aorta (Deshpande *et al.*, 1998). A invasão celular de células epiteliais humanas é uma propriedade patogênica chave para várias espécies bacterianas encontradas em uma variedade de gêneros e associadas a infecções tanto agudas quanto crônicas (Lamont *et al.*, 1995). Comum a todos esses eventos é a necessidade da bactéria primeiro aderir à membrana celular e então induzir uma série de mudanças bioquímicas e estruturais, no microrganismo ou na célula ou em ambos, culminando na penetração bacteriana. *P. gingivalis* parece estar adaptada à vida no interior das células epiteliais da gengiva (Weinberg *et al.*, 1997).

As amostras de *P. gingivalis* foram incubadas com monocamadas de células KB por uma hora, seguido de lavagem e nova incubação com metronidazol por mais três horas para a remoção das bactérias extracelulares, fazendo-se em seguida uma reação de imunoperoxidase para a visualização da invasão celular. Em todos os testes pôde-se observar bactérias internalizadas, confirmando o que já foi descrito por alguns autores.

Lamont *et al* (1995) verificaram a presença de bactérias internalizadas sem encapsulamento por vacúolos endocíticos, enquanto que Sandros *et al* (1994) documentaram a presença de *P. gingivalis* no citoplasma celular freqüentemente envolvidas por membranas endossomais. Neste trabalho, foram consideradas bactérias invasoras as que estavam envolvidas por vacúolos.

A invasão de *P. gingivalis* requer gasto de energia metabólica tanto da bactéria como da célula, já que a sinalização celular e síntese bacteriana estão envolvidas no processo de invasão. *P. gingivalis* produz um número de proteases

com diferentes especificidades. Os mecanismos utilizados para a invasão de *P. gingivalis* parecem ter similaridade com os de outros patógenos invasivos (Lamont *et al.*, 1995).

Scaletsky *et al* (1984) testaram várias amostras de *Escherichia coli* quanto à sua capacidade de aderir às células HeLa com a adição de D-manose ao meio de cultura celular. Desta maneira, torna-se possível distinguir aderência manose-sensível ou manose-resistente.

No trabalho de Okuda *et al* (1981), testes de aglutinação de eritrócitos e de adesão de *P. gingivalis* às células epiteliais foram totalmente bloqueados com o pré-tratamento das bactérias com saliva ou soro humano. Os autores fazem referência às glicoproteínas derivadas do hospedeiro que poderiam se ligar ao sítio receptor da bactéria, impedindo sua adesão às células.

Baseados nestas pesquisas, foram testados no presente trabalho vários tipos de açúcares, além de soro humano e soro fetal bovino. Somente quando houve tratamento das células com soro ocorreu inibição da hemaglutinação e do processo de adesão, o mesmo não ocorrendo quando do pré-tratamento das bactérias. Estes achados não coincidem com os de Okuda *et al* (1981), sugerindo que algum componente presente no soro humano e no soro fetal bovino, podendo ser uma proteína ou glicoproteína, ou mesmo uma molécula de gordura, que seria capaz de ligar-se ao sítio receptor da célula, impedindo assim a sua interação com a fímbria bacteriana. Também não houve nenhum tipo de inibição quando da utilização dos diferentes açúcares, sugerindo que o sítio receptor da bactéria na célula não seria um dos açúcares testados.

6. CONCLUSÕES:

6.1. *Porphyromonas gingivalis* pode ser isolada da bolsa periodontal de pacientes com periodontite, com cultivo em ágar sangue seletivo contendo antibióticos como bacitracina, ácido nalidíxico e sulfato de colistina, sob anaerobiose.

6.2. A metodologia empregada para a identificação da *Porphyromonas gingivalis* (produção de pigmento escuro em ágar sangue, coloração de Gram, crescimento sob atmosfera anaeróbia, produção de catalase, aglutinação de eritrócitos de carneiro e PCR) foi adequada, sendo que das quatro amostras suspeitas três delas apresentaram resultado positivo no PCR, para a detecção da fímbria do patógeno.

6.3. O anti-soro policlonal obtido a partir da imunização de coelhos foi eficiente para os fins para os quais foi produzido (reação de imunoperoxidase e dot-blot).

6.4. A reação de imunoperoxidase foi mais eficiente que a coloração de Kinyon para a visualização da bactéria em suas interações de adesão e invasão em células KB.

6.5. Os açúcares testados não inibiram a adesão da bactéria em células KB, assim como também não inibiram a aglutinação de eritrócitos de carneiro.

- 6.6.** Os soros humano e fetal bovino, quando utilizados nas células KB e nos eritrócitos de carneiro, inibiram a adesão da *Porphyromonas gingivalis* e a hemaglutinação.
- 6.7.** Os mesmos soros, quando colocados em contato com as bactérias, não inibiram a adesão e a hemaglutinação.
- 6.8.** As amostras isoladas dos pacientes com doença periodontal tiveram o mesmo comportamento da amostra padrão ATCC 33277 em todos os testes realizados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, R.W.; Johannessen, A.C.; Dahlén, G.; Socransky, S.S. and Skaug, N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in Northern Cameroon. **J. Clin. Periodontol.** 24: 830-845, 1997.
- Amano, A.; Sharma, A.; Lee, J.J., Sojar, H.T.; Raj, P.A. and Genco, R.J. Structural domains of *Porphyromonas gingivalis* recombinant fimbriin that mediate binding to salivary proline-rich protein and statherin. **Infect. Immun.** 64: 1631-1637, 1996.
- Bird, P.S.; Gemmell, E.; Polak, B.; Paton, R.G.; Sosroseno, W. and Seymour, G.J. Protective immunity to *Porphyromonas gingivalis* infection in a murine model. **J. Periodontol.** 66: 351-362, 1995.
- Bollows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W. and Schfeifer, K.H. In: "The Prokaryotes", 2^a ed., vol. IV, 1991.
- Brant, E.E.; Sojar, H.T.; Sharma, S.; Bedi, G.S.; Genco, R.J. and De Nardin, E. Identification of linear antigenic sites on the *Porphyromonas gingivalis* 43-kDa fimbriin subunit. **Oral Microbiol. Immunol.** 10: 146-150, 1995.
- Cardoso, J.C.V. 1997. Resumo do Curso Internacional de Periodontia - Prof. Anders Gustafson [on line]. Disponível na Internet via <http://www.odontologia.com.br/servlet/HdleArtigo?id=57&idesp=15&ler=s>. Arquivo capturado em 03 de outubro de 1999.
- Chen, Z.; Potempa, J.; Polanowski, A.; Wikstrom, M. and Travis, J. Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. **J. Biol. Chem.** 267: 18896-18901, 1992.
- Ciborowski, P.; Nishikata, M.; Allen, R.D. and Lantz, M.S. Purification and characterization of two forms of a high-molecular weight cysteine proteinase (porphypain) from *Porphyromonas gingivalis*. **J. Bacteriol.** 176: 4549-4557, 1994.

- Colombo, A.P.; Haffajee, A.D.; Dewhirst, F.E.; Pasteur, B.J.; Smith, C.M.; Cugini, M.A. and Socransky, S.S. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. **J. Clin. Periodontol.** 25: 169-180, 1998.
- Deshpande, R.G.; Khan, M.B. and Genco, C.A. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.** 66: 5337-5343, 1998.
- Duncan, M.J.; Nakao, S.; Skobe, Z. and Xie, H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. **Infect. Immun.** 61: 2260-2265, 1993.
- Dzink, J.L.; Tanner, A.C.R.; Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. **J. Clin. Periodontol.** 12: 648-659, 1985.
- Ebersole, J.L. and Steffen, M.J. Human antibody responses to outer envelope antigens of *Porphyromonas gingivalis* serotypes. **J. Period. Res.** 30: 1-14, 1995.
- Ewing, W.H. In: "Edwards and Ewing's. Identification of Enterobacteriaceae". 4th ed., New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc, 1986. 536p, ISBN 0444009817
- Fine, D.H. Incorporating new technologies in periodontal diagnosis into training programs and patient care: a critical assessment and a plan for the future. **J. Periodontol.** 63: 383-393, 1992.
- Fletcher, H.M.; Schenkein, H.A.; Morgan, R.M.; Bailey, K.A.; Berry, C.R. and Macrina, F.L. Virulence of a *Porphyromonas gingivalis* W83 mutant defective in the prnH gene. **Infect. Immun.** 63: 1521-1528, 1995.
- Fravalo, P.; Ménard, C. and Bonnaure-Mallet, M. Effect of *Porphyromonas gingivalis* on epithelial cell MMP-9 type IV collagenase production. **Infect. Immun.** 64: 4940-4945, 1996.
- Fujimura, S. and Nakamura, T. Isolation and characterization of a protease from *Bacteroides gingivalis*. **Infect. Immun.** 55: 716-720, 1987.

Genco, R.J. Current view of risk factors for periodontal diseases. **J. Periodontol.** 67: 1041-1049, 1996.

Greenstein, G. and Caton, J. Periodontal disease activity: a critical assessment. **J. Periodontol.** 61: 543-552, 1990.

Griffen, A.L.; Becker, M.R.; Lyons, S.R.; Moeschberger, M.L. and Leys, E.J. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. **J. Clin. Microbiol.** 36: 3239-3242, 1998.

Haga, I. R. **Picobimavírus: pesquisa de novos hospedeiros animais, identificação através de ensaio de dot-blot e métodos de purificação.** Campinas: UNICAMP, 1998. 72p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

Hayashi, J.; Saito, I.; Ishikawa, I. and Miyasaka, N. Effects of cytokines and periodontopathic bacteria on the leukocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 pathway in gingival fibroblasts in adults periodontitis. **Infect. Immun.** 62: 5205-5212, 1994.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. In: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p. ISBN 0-683-00603-7.

Hunt, D.E.; Jones, J.V. and Dowell, Jr.V.R. Selective medium for the isolation of *Bacteroides gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.** 23: 441-445, 1986.

Ito, H-O; Hirata, M. and Koga, T. Hen egg-white lysozyme inhibits biological activities of lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. **J. Periodont. Res.** 32: 295-299, 1997.

Kadono, H.; Kido, J.; Kataoka, M.; Yamauchi, N. and Nagata, T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.** 67: 2841-2846, 1999.

Kaminishi, H.; Cho, Tamaki.; Itoh, T.; Iwata, A.; Kawasaki, K.; Hagihara, Y. and Maeda, H. Vascular permeability enhancing activity of *Porphyromonas gingivalis* protease in guinea pigs. **FEMS Microbiol. Let.** 114: 109-114, 1993.

Kato, S.; Muro, M.; Akifusa, S.; Hanada, N.; Semba, I.; Fujii, T.; Kowashi, Y. and Nishihara, T. Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. **Infect. Immun.** 63: 3914-3919, 1995.

Kawata, Y.; Hanazawa, S.; Amano, S.; Murakami, Y.; Matsumoto, T.; Nishida, K. and Kitano, S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae stimulate bone resorption in vitro. **Infect. Immun.** 62: 3012-3016, 1994.

Kawata, Y.; Iwasaka, H.; Kitano, S. and Hanazawa, S. *Porphyromonas gingivalis* fimbria-stimulated bone resorption is inhibited through binding of the fimbriae to fibronectin. **Infect. Immun.** 65: 815-817, 1997.

Kinane, D.F.; Lappin, D.F.; Koulouri, O. and Buckley, A. Humoral immune responses in periodontal disease may have mucosal and systemic immune feature. **Clin. Exp. Immunol.** 115: 534-541, 1999.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C. and Tenover, W.C. In "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology". 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1395p.

Kontani, M.; Kimura, S.; Nakagawa, I. and Hamada, S. Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to matrix proteins via a fimbrial cryptic receptor exposed by its own arginine-specific protease. **Mol. Microbiol.** 24: 1179-1187, 1997.

Kopp, P.A.; Dutra, I.S.; Döbereiner, J.; Schmitt, M.; Grassmann, B. and Blobel, H. Estreptomicina aumenta a aderência em células epiteliais de *Bacteroides melaninogenicus* associado às lesões peridentárias da cara inchada dos bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 16:53-57, 1996.

Komman, K.S.; Newman, M.G.; Alvarado, R.; Fleming, T.F.; Nachnani, S. and Tumbusch, J. Clinical and microbiological patterns of adults with periodontitis. **J. Periodontol.** 62: 634-642, 1991.

Laine, M.I.; Appelmeik, B.J. and van Winkelhoff, A.J. Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* em periodontitis patients. **J. Dent. Res.** 76: 1840-1844, 1997.

- Laine, M.I.; Appelmek, B.J. and van Winkelhoff, A.J. Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. **J. Periodon. Res.** 31: 278-284, 1996.
- Lamont, R.J.; Chan, A.; Belton, C.M.; Izutsu, K.T.; Vasel, D. and Weinberg, A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. **Infect. Immun.** 63: 3878-3885, 1995.
- Lamont, R.J. and Jenkinson, H.F. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62: 1244-1263, 1998.
- Lamont, R.J.; Oda, D.; Persson, R.E. and Persson, G.R. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. **Oral Microbiol. Immunol.** 7: 364-367, 1992.
- Madianos, P.N.; Papapanou, P.N.; Nannmark, U.; Dahlén, G. and Sandros, J. *Porphyromonas gingivalis* FDC 381 multiplies and persists within human oral epithelial cells. **Infect. Immun.** 64: 660-664, 1996.
- McGraw, W.T.; Potempa, J.; Farley, D. and Travis, J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase. **Infect. Immun.** 67: 3248-3256, 1999.
- Michalany, J. In: "Técnicas histológicas em anatomia patológica". 1ª ed. São Paulo: Editora. Pedagógica Universitária, 1980. 277p.
- Moncla, B.J.; Braham, P.H.; Persson, G.R.; Page, R.C. and Weinberg, A. Direct detection of *Porphyromonas gingivalis* in *Macaca fascicularis* dental plaque samples using an oligonucleotide probe. **J. Periodontol.** 65: 398-403, 1994.
- Nelson, D.; Potempa, J.; Kordula, T. and Travis, J. Purification and characterization of a novel cysteine proteinase (periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*- Evidence for a role in inactivation of human alpha(1)-proteinase inhibitor. **J. Biol. Chem.** 274: 12245-12251, 1999.

Njoroge, T.; Genco, R.J.; Sojar, H.T.; Hamada, N. and Genco, C.A. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. **Infect. Immun.** 65: 1980-1984, 1997.

Ogawa, T.; Mukai, T.; Yasuda, K.; Shimauchi, H.; Toda, Y. and Hamada, S. Distribution and immunochemical specificities of fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and related bacterial species. **Oral Microbiol. Immunol.** 6: 332-340, 1991.

Ogawa, T.; Yasuda, K.; Yamada, K.; Mori, H.; Ochiai, K and Hasegawa, M. Immunochemical characterization and epitope mapping of a novel fimbrial protein (Pg-II fimbria) of *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS Immun. Med. Microbiol.** 11: 247-256, 1995.

Okuda, K.; Slots, J. and Genco, R..J. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides asaccharolyticus*, and *Bacteroides melaninogenicus* subspecies: cell surface morphology and adherence to erythrocytes and human buccal epithelial cells. **Curr. Microbiol.** 6: 7-12, 1981.

Polson, A.M. and Goodson, J.M. Periodontal diagnosis - current status and future needs. **J. Periodontol.** 56: 25-34, 1984.

Renvert, S.; Wikström, M.; Helmesson, M.; Dahlén, G. and Claffey, N. Comparative study of subgingival microbiological sampling techniques. **J. Periodontol.** 63: 797-801, 1992.

Riggio, M.P.; Macfalane, T.W.; Mackenzie, D.; Lennon, A.; Smith, A.J. and Kinane, D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetencomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J. Periodont. Res.** 31: 496-501, 1996.

Sandros, J.; Papapanou, P.N.; Nannmark, U. and Dahlén, G. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium *in vitro*. **J. Periodont. Res.** 29:62-69, 1994.

Shah, H.N. and Collins, M.D. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 38: 128-131, 1988.

Sharma, A.; Honma, K.; Sojar, H.T.; Hruby, D.E.; Kuramitsu, H.K. and Genco, R.J. Expression of saliva-binding epitopes of the *Porphyromonas gingivalis* FimA protein on the surface of *Streptococcus gordonii*. **Bioch. Biophys. Res. Commun.** 258: 222-226, 1999.

Scaletsky, I.C.A.; Silva, M.L.M. and Trabulsi, L. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.** 45: 534-536, 1984.

Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C. and Kent Jr, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.** 25: 134-144, 1998.

Soliman, A. K.; Watts, D. M.; Salib, A. W.; Shehata, A.E.D.; Arthur, R.R. and Botros, B.A.M. Application of an immunoperoxidase monolayer assay for the detection of arboviral antibodies. **J. Virol. Metds.** 65: 147-151, 1997.

Tanner, A.; Maiden, M.F.J.; Macuch, P.J.; Murray, L.L. and Kent Jr, R.L. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. **J. Clin. Periodontol.** 25: 85-98, 1998.

Theilade, E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.** 13: 905-911, 1986.

Timmerman M.F.; Van der Weijden, G.A.; Armand, S.; Abbas, F.; Winkel, E.G.; Van Winkelhoff, A.J. and Van der Velden, U. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Clinical and microbiological baseline data. **J. Clin. Periodontol.** 25: 215-224, 1998.

Tokuda, M.; Duncan, M.; Choo, M.I. and Kuramitsu, H.K. Role of *Porphyromonas gingivalis* protease activity in colonization of oral surfaces. **Infect. Immun.** 64: 4067-4073, 1996.

Topley, W.W.C.; Wilson, G.S. and Miles, A.A. In: "Topley & Wilson's-Principles of bacteriology, virology and immunity". 8th ed, London: E. Arnold, 1990, pg 554. 5v.

- Tuite-McDonnell, M.; Griffen, A.L.; Moeschberger, M.L.; Dalton, R.E.; Fuerst, P.A. and Leys, E.J. Concordance of *Porphyromonas gingivalis* colonization in families. **J. Clin. Microbiol.** 35: 455-461, 1997.
- van Winkelhoff, A.J.; van Steenberg, T.J.M.; Kippuw, N. and Graaff, J. Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from the oral cavity. **J. Clin. Microbiol.** 22: 75-79, 1995.
- Watanabe, K. and Frommel, T.O. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of polymerase chain reaction. **J. Dent. Res.** 72: 1040-1044, 1993.
- Weinberg, A.; Belton, C.M.; Park, Y. and Lamont, R.J. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. **Infect. Immun.** 65: 313-316, 1997.
- Xie, H.; Cai, S. and Lamont, R.J. Environmental regulation of fimbrial gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.** 65: 2265-2271, 1997.
- Zhang, J.; Dong, H.; Kashket, S. and Duncan, M.J. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. **Microb. Pathog.** 26: 275-280, 1999.

APÊNDICE

1. Ágar sangue seletivo para *Porphyromonas gingivalis*

a) Fórmula

Componente	Quantidade
Columbia ágar base	42,5 g
Ágar	6,5 g
Hemina	5,0 mg
Menadiona	10,0 mg
Sulfato de colistina	10,0 mg
Ácido nalidíxico	15,0 mg
Bacitracina	10,0 mg
Água desmineralizada	1000,0 ml
Sangue desfibrinado estéril de carneiro	50,0 ml

2. Ágar Brucella (Columbia ou sangue)

a) Fórmula

Componente	Quantidade
Água destilada	250,0 ml
Ágar Brucella	10,75 g
Hemina (5mg/ml)	250,0 µl
Menadiona (1mg/ml)	10,0 µl
Sangue desfibrinado estéril de carneiro	12,5 ml

3. BHI para *Porphyromonas gingivalis*

a) Fórmula

Componente	Quantidade
Água destilada	200,0 ml
BHI	7,4 g
Extrato de levedura	10,75 g
Peptona	0,6 g
Bicarbonato de sódio	0,4 g
Hemina	40,0 µl
Menadiona	10,0 µl

4. Soluções para a extração de DNA

4.1. Tampão TE

a) Fórmula

Componente	concentração
Tris/HCl pH 8,0	10mM
EDTA	10mM
SDS	10%

b) Observações

Aquecer a 65° C para dissolver

4.2. Proteinase K

a) Fórmula

Componente	concentração
Proteinase k	10mg/ml de água Milli-Q

b) Observações:

Estocar em alíquotas a 20°C

4.3. Solução SDS/proteinase K

a) Fórmula

Componente	quantidade
solução de proteinase K	5 ml
SDS 10%	70 ml

4.4. NaCl 5M

a) Fórmula

Componente	quantidade
NaCl	29,2 g em 100ml de água milli-Q

4.5. Solução CTAB/NaCl

a) Fórmula

Componente	Quantidade
NaCl	4,1 g em 80 ml de água mili-Q
CTAB	10 g

b) Observações:

Aquecer a 65°C para dissolver.
Ajustar o volume para 100 ml.
Estocar em temperatura ambiente

5. Corantes

5.1. Hematoxilina de "Ehrlich":

5.1.1. Fórmula

Componente	Quantidade
Hematoxilina	2g em 100ml de álcool 96°
Ácido acético	10,0 ml
Glicerina PA	100,0 ml
Alúmen de potássio	3,0 g
Água destilada	100,0 ml

5.1.2. Observações

Dissolver a hematoxilina no álcool e o alúmen na água destilada
Colocar a solução de hematoxilina aos poucos na solução de alúmen sob agitação.
Adicionar aos poucos a glicerina e o ácido acético
Filtrar usando filtro de papel para café
Deixar em repouso por no mínimo 3 meses para amadurecer, em frasco claro, tampando a boca apenas com gaze

5.2. Fucsina básica de Kinyon:

5.2.1. Fórmula

Componente	Quantidade
Fucsina básica	4g
Fenol	8g
Álcool 95%	20ml
Água destilada	100ml

5.2.2. Observações

Dissolver a fucsina no álcool e juntar o fenol, depois a água

5.3. Azul de metileno – solução estoque:

5.3.1.Fórmula

Componente	Quantidade
Azul de metileno	1,4g
Álcool 95%	100ml

5.3.2.Observações

Usar diluído 10% em água destilada

5.4. Álcool-ácido

5.4.1.Fórmula

Componente	Quantidade
Álcool 90%	100 ml
Ácido acético	2 ml