

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Patrícia Souza Closs Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS CATECOLAMINAS E DO
CORTISOL SOBRE O CRESCIMENTO E VIRULÊNCIA DE
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

Taubaté – SP
2013

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Patrícia Souza Closs Ferreira

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS CATECOLAMINAS E DO
CORTISOL SOBRE O CRESCIMENTO E VIRULÊNCIA DE
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor pelo Programa de Pós-graduação em
Odontologia, nível Doutorado, da
Universidade de Taubaté.

Área de concentração: Biologia

Orientadora: Prof. Dra. Karina Cogo

Co-Orientador: Prof.Dr.Gilson Cesar Nobre
Franco

Taubaté – SP
2013

**Ficha catalográfica elaborada por
Liliane Castro – Bibliotecária CRB-8/6748**

C645a Ferreira, Patrícia Souza Closs
Avaliação dos efeitos das catecolaminas e do cortisol sobre o crescimento e virulência de *Porphyromonas gingivalis* / Patrícia Souza Closs. - 2013.
81f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade de Taubaté, Departamento de Pós-graduação em Odontologia, 2013.

Orientação: Profa. Dra. Karina Cogo, Departamento de Pós-graduação em Odontologia.

1. *Porphyromonas gingivalis*. 2. Estresse fisiológico.
3. Catecolaminas. 4. Cortisol. 5. Periodontite. I. Título.

PATRÍCIA SOUZA CLOSS FERREIRA

Data: 04 / 12/ 2013

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Karina Cogo

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino

Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Profa. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

Universidade Estadual de
Campinas

Assinatura: _____

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho

Assinatura: _____

Dedico esta, bem como todas as minhas
demais conquistas, aos meus amados
pais, João Closs Júnior e Ruth Souza
Closs.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu amado e querido pai: João Closs Obrigada!!!!

Por ter me entendido enquanto eu crescia e por ter aceitado minhas tão rápidas mudanças. Deve ter sido difícil manter-se em calma comigo, mas você sempre tentou e quase sempre conseguiu.

Por ter me ouvido e ter me dado claras e breves respostas às dúvidas e perguntas que eu levava a você.

Por ter reforçado minha confiança para continuar revelando meus pensamentos e sentimentos.

Por ter me aplaudido quando fui verdadeira, por ter me compreendido quando eu disse mentiras, por ter me provado que elas maculam nosso caráter.

Por ter me falado sobre os seus erros e sobre as coisas que você aprendeu com eles. Isso fez com que eu aceitasse meus próprios erros, que também aprendesse e que me perdoasse.

Por prestar-me atenção e gastar tão grande parte do seu tempo comigo. Isso levou-me a acreditar que sou importante e que tenho muito valor.

Por agir sempre do modo que desejou que eu agisse. Foi assim que você me deu um modelo positivo para seguir.

Por confiar em mim e me respeitar mesmo quando eu era menor do que você.

Por ter considerado meus sentimentos e necessidades, e ter me mostrado muitas vezes que elas eram semelhantes às suas.

Pelos elogios e pelos incentivos. Foi sempre por isso que eu me senti uma boa pessoa e quis continuar sendo digna da sua confiança em mim.

Por ajudar-me a explorar meus talentos e potenciais.

Por ter me ensinado que para ser feliz eu tinha que ser eu mesma e não como você ou igual a outros que você admirava.

Por ser você mesmo e por não desistir da felicidade. Com isso eu aprendi a buscar uma vida feliz, bem sucedida e satisfatória.

Obrigado Pai por sempre ter me ouvido. Ouça-me mais uma vez agora:

EU AMO VOCÊ!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Agradeço também ao meu esposo, James Willian Ferreira de Souza, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, me incentivando em todo tempo para não desistir.

Quero agradecer também as pessoas mais preciosas de minha vida, minha princesa linda, minha filha Esther e meu príncipezinho lindo, meu filho amado João Pedro, que embora não tivessem conhecimento disto, iluminaram de maneira especial meus pensamentos, levando-me a buscar mais conhecimentos.

À Universidade de Taubaté, por meio do reitor Prof. Dr. José Rui Camargo, e do pró-reitor em pesquisa, Prof. Dr. Edson Aparecida de Araújo Querido Oliveira,

À pós-graduação em Odontologia, por meio dos coordenadores Prof. Dr. José Roberto Cortelli e Prof^a. Dr^a. Ana Christina Claro Neves,

Aos professores e amigos da Pós-Graduação em Odontologia,

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo Auxílio pesquisa concedido (processo # 09/08285-9),

Agradeço a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Karina Cogo Müller, pela competência e dedicação na condução deste trabalho.

Ao meu Co-Orientador Prof.Dr.Gilson Cesar Nobre Franco, muito obrigada por tudo o que fez por mim, o senhor é um grande exemplo como profissional , amigo e docente.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a pós-graduação, durante meu mestrado; em especial, ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli, à Prof^a. Dr^a. Sheila Cavalca Cortelli, à Prof^a. Dr^a. Ana Christina Claro Neves e ao Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco.

À Adriana Pelligia e a todo o pessoal da secretaria, bem como os funcionários da Faculdade, à Juliana Guimarães pelo apoio na parte laboratorial e à bibliotecária Liliane pela atenção e disponibilidade em ajudar. A amiga e colega aluna de graduação do curso de Odontologia da UNITAU Thays Poppi Moreira Faria

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Departamento de Ciências Fisiológicas - Área de Farmacologia Anestesiologia e Terapêutica na pessoa do Prof. Francisco Carlos Groppo. por permitir a utilização deste laboratório.

À querida Talita Signoreti Graziano e todos os alunos de pós-graduação em Farmacologia da FOP-UNICAMP, e a funcionária Eli, pela gentileza com que me acolheram. Obrigada a todos!

Agradeço à minha professora de graduação, Prof^a. Dr^a. Viviane Curi, por ter despertado em mim um grande amor pela Odontologia.

Agradeço à Faculdade São Lucas, em especial à Doutora Eliza Aguiar, a senhora é um grande exemplo pra mim, como pessoa, mãe e profissional. À

professora e colega, Eloá Gazola, pelo incentivo. Vocês foram fundamentais neste processo. À professora Iracema do Amaral Ribeiro muito obrigada !!!

Minha mãezinha amada, muito obrigada por tudo que fez, e faz por mim, não tenho palavras para agradecer; a senhora é o maior exemplo de uma mulher sábia que edifica sua casa, seu testemunho de vida é irrepreensível e nunca teria conseguido chegar até aqui sem a senhora sempre do meu lado.

Minha irmã e amiga, Juliana Souza Closs Ferreira!!! Obrigada por tudo; e meus dois preciosos sobrinhos, João Humberto e Gabriel, obrigada pela paciência, pelo incentivo, pela força e principalmente pelo carinho.

À Família Ferreira, minhas cunhadas que amo muito (Melba, Lúcia, Keila, Cléia, Vânia, Dalqui), muito obrigada.

Valeu a pena toda distância, todo sofrimento, todas as renúncias... Valeu a pena esperar... Hoje estamos colhendo, juntos, os frutos do nosso empenho!

Esta vitória é nossa!!!

Ferreira PSC. Avaliação dos efeitos das catecolaminas e do cortisol sobre o crescimento e virulência de *Porphyromonas gingivalis* [Tese de doutorado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2013. 81p.

RESUMO

Hipótese: O presente estudo teve como hipótese que a adrenalina, a noradrenalina e o cortisol, hormônios liberados em grandes quantidades durante o estresse fisiológico, poderiam ser capazes de alterar o crescimento e de aumentar a virulência de *Porphyromonas gingivalis*, estimulando a expressão de genes relacionados à virulência, estresse oxidativo e metabolismo do ferro, podendo agravar a condição periodontal em indivíduos com periodontite. **Objetivos:** Assim o presente projeto visou avaliar a interferência desses hormônios relacionados ao estresse sobre o crescimento, viabilidade, susceptibilidade antimicrobiana e virulência de *Porphyromonas gingivalis*. **Método:** Culturas de *Porphyromonas gingivalis* W83 foram expostas à adrenalina, noradrenalina e cortisol, utilizando três meios de cultura (TSB-HM, SAPI e SAPI-HM) e foram incubadas em estufa de anaerobiose para avaliação quanto ao crescimento e viabilidade. Essas culturas foram testadas quanto à sensibilidade ao metronidazol após exposição às catecolaminas e ao cortisol. Possíveis alterações da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, metabolismo do ferro e fatores de virulência foram verificados pela técnica de qRT-PCR. **Resultados:** As catecolaminas e o cortisol, de forma geral, não interferiram no crescimento de *P. gingivalis*, independente das condições nutricionais a que ela foi exposta e dos tempos avaliados ($p > 0.05$, ANOVA). A sensibilidade de *P. gingivalis* ao antimicrobiano metronidazol não se alterou na presença de adrenalina, noradrenalina ou cortisol ($p > 0.05$, Kruskal Wallis). No entanto, a exposição bacteriana a adrenalina, noradrenalina e/ou cortisol elevaram os níveis de RNAm de genes relacionados à obtenção de ferro (*hmuR*); estresse oxidativo (*tpx*, *oxyR*, *dps*, *sodB*, *aphC*), hemólise (*hem*, *hagA*) e proteína de superfície imunodominante (*ragA*) (teste de modo pareado fixo de realocação ao acaso, $p < 0.05$). Os resultados do presente estudo sugerem que as catecolaminas e o cortisol podem influenciar na expressão de fatores relacionados à virulência e ao estresse oxidativo de *P. gingivalis*.

Palavras-chave: *Porphyromonas gingivalis*; Estresse fisiológico; Catecolaminas; Cortisol; Periodontite.

Ferreira PSC. Evaluation of the effects of catecholamines and cortisol on the growth and virulence of *Porphyromonas gingivalis* [Thesis]. Taubaté; University of Taubaté, Graduate Program in Dentistry, 2013. 81p.

ABSTRACT

Hypothesis: This study hypothesized that adrenaline, noradrenaline and cortisol, hormones released in large quantities during the physiological stress, might be able to alter the growth and increase the virulence of *Porphyromonas gingivalis* by stimulating the expression of genes related to virulence, oxidative stress and iron metabolism and may aggravate periodontal status in subjects with periodontitis. Objectives: So this project aimed to evaluate the effect of these stress-related hormones on growth, viability, virulence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis*. Method: *Porphyromonas gingivalis* W83 cultures were exposed to adrenaline, noradrenaline and cortisol, using three culture media (TSB - HM, SAPI and SAPI - HM) and were incubated in anaerobiosis for review on the growth and viability. These cultures were tested for sensitivity to metronidazole after exposure to catecholamines and cortisol. Possible changes in the expression of genes related to oxidative stress, iron metabolism and virulence factors were verified by qRT-PCR technique. Results: The catecholamines and cortisol, in general, did not affect the growth of *P. gingivalis*, independent of nutritional conditions to which she was exposed and evaluated times ($p > 0.05$, ANOVA). The sensitivity of *P. gingivalis* antimicrobial metronidazole did not change in the presence of adrenaline, noradrenaline and cortisol ($p > 0.05$, Kruskal Wallis). However, bacterial exposure to adrenaline, noradrenaline and / or cortisol increased mRNA levels of genes related to iron acquisition (*hmuR*), oxidative stress (*tpx*, *oxyR*, *dps*, *sodB*, *aphC*), hemolysis (*hem*, *hagA*) and immunodominant surface protein (*ragA*) (test paired mode relocation fixed at random, $p < 0.05$). The results of this study suggest that catecholamines and cortisol can influence the expression of factors related to oxidative stress and virulence of *P. gingivalis*.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*; Physiological stress; Catecholamines; Cortisol; Periodontitis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Crescimento de *P. gingivalis* durante 48 horas em meio TSB 51
- Figura 2 - Crescimento de *P. gingivalis* durante 48 horas em meio SAPI 51
- Figura 3 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio SAPI após 24 e 48 horas de exposição à adrenalina, noradrenalina e cortisol ($p>0,05$; ANOVA) 53
- Figura 4 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio SAPI-HM após 24 e 48 horas de exposição à adrenalina, noradrenalina e cortisol ($p>0,05$; ANOVA) 53
- Figura 5 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660 nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio TSB-HM após 24 e 48 horas de exposição à adrenalina, noradrenalina e cortisol (O símbolo (*) representa diferença estatística em relação ao controle; $p<0,05$; ANOVA, Dunnet) 54
- Figura 6 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660 nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio SAPI no tempo de 24 horas, após exposição de 4 horas à adrenalina, noradrenalina e cortisol (exposição iniciada no tempo 24 h de crescimento; $p>0,05$; ANOVA) 55
- Figura 7 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio SAPI-HM com hemina e menadiona no tempo de 28 horas, após exposição de 4 horas à adrenalina, noradrenalina e cortisol (exposição iniciada no tempo 24 h de crescimento, $p>0,05$; ANOVA) 55
- Figura 8 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660 nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio TSB-HM no tempo de 20 horas, após exposição de 4 horas à adrenalina, noradrenalina e cortisol (exposição iniciada no tempo 16 h de crescimento $p>0,05$; ANOVA) 56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média e desvio padrão da porcentagem de redução de bactérias viáveis após a incubação com metronidazol por uma hora dos grupos adrenalina, noradrenalina, cortisol e seus respectivos controles não tratados 57
- Tabela 2 - Razão de expressão gênica em relação ao grupo controle para os grupos adrenalina, noradrenalina e cortisol. Valores referentes ao número de vezes que o gene foi expresso em relação ao grupo controle (controle - expressão igual a 1) 59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 DOENÇA PERIODONTAL E A PREVALÊNCIA DE P. GINGIVALIS NA PERIODONTITE CRÔNICA	18
2.2 P. GINGIVALIS, SUAS CARACTERÍSTICAS E SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL	22
2.3 A RELAÇÃO DO ESTRESSE COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DAS PERIODONTITES	25
2.4 AS CATECOLAMINAS E A RELAÇÃO COM OS MICRO-ORGANISMOS	30
3 PROPOSIÇÃO	38
3.1 OBJETIVOS GERAIS	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	39
4.2 AMOSTRA BACTERIANA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	39
4.3 PADRONIZAÇÃO E PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA	40
4.4 ENSAIOS DE SENSIBILIDADE DE P. GINGIVALIS W83 NA PRESENÇA DE ADRENALINA, NORADRENALINA E CORTISOL	42
4.4.1 Ensaios de sensibilidade de P. gingivalis W83 exposta às substâncias teste no tempo inicial de crescimento	42
4.4.2 Ensaios de sensibilidade de P. gingivalis W83 exposta às substâncias teste na fase logarítmica de crescimento	43
4.5 ENSAIO DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA AO METRONIDAZOL	44
4.6 EXTRAÇÃO DE RNA E PCR EM TEMPO REAL	46
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS	50
5.1 CRESCIMENTO DE P. GINGIVALIS NOS MEIOS TSB E SAPI	50
5.2 ENSAIOS DE SENSIBILIDADE DE P. GINGIVALIS W83 EXPOSTA ÀS SUBSTÂNCIAS TESTE NO TEMPO INICIAL DE CRESCIMENTO	52
5.3 ENSAIOS DE SENSIBILIDADE DE P. GINGIVALIS W83 EXPOSTA ÀS SUBSTÂNCIAS TESTE NA FASE LOGARÍTMICA DE CRESCIMENTO	54
5.4 ENSAIO DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA AO METRONIDAZOL NA PRESENÇA DE ADRENALINA, NORADRENALINA E CORTISOL	56

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	58
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As doenças periodontais são manifestações complexas e multifatoriais caracterizadas por lesões inflamatórias mediadas por interações entre hospedeiro e micro-organismos, levando a destruição dos tecidos periodontais (Loe et al., 1965; Van Dyke & Van Winkelhoff, 2013). *Porphyromonas gingivalis*, um bacilo anaeróbio gram negativo relacionado à etiologia das periodontites, é um patógeno que reside principalmente no biofilme subgingival (Yilmaz et al., 2004). Essa bactéria apresenta vários fatores de virulência como proteases, fímbrias, lipopolissacarídeos e adesinas que estão envolvidas na destruição dos tecidos periodontais e na estimulação da resposta imune e inflamatória do hospedeiro (Imamura, 2003; Bostanci & Belibasakis, 2012).

Apesar de a presença bacteriana ser importante para o desenvolvimento das periodontites, esse fator isolado parece não ser capaz de promover o desenvolvimento da doença. Indicadores de risco como o fumo, presença de diabetes mellitus, entre outros, associados à presença de alguns patógenos específicos, são capazes de modificar a progressão das periodontites (Peruzzo et al., 2008). Outros fatores como estresse, depressão e ansiedade, apesar de não serem identificados como fatores de risco absoluto para as doenças periodontais, vêm sendo apontados como fatores que podem contribuir para o agravamento da condição periodontal em pacientes com periodontite (Vettore et al., 2003, 2005; Ng & Leung, 2006; Ishisaka et al., 2007, 2008; Peruzzo et al., 2008; Akcali et al., 2013).

Tem sido reportado que as catecolaminas, cuja liberação está aumentada durante respostas ao estresse (Cryer, 1980), têm efeitos no desenvolvimento de doenças infecciosas e no crescimento e expressão de virulência de alguns patógenos (Lyte, 1993; Nakano et al., 2007; Karavolos et al., 2008; Freestone et al., 2008). Ainda, alguns estudos têm mostrado uma relação entre o aumento de glicocorticóides e catecolaminas sobre a supressão da resposta imune em indivíduos expostos a uma variedade de condições potencialmente estressantes (Black, 1994; Taylor et al., 1997; Sonnenfeld, 1998).

Numa tentativa de compreender a interação das doenças infecciosas e as substâncias relacionadas ao estresse, estudos tem focado nos efeitos diretos da adrenalina e noradrenalina no crescimento e patogenicidade dos micro-organismos. Têm sido demonstrados que micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* e espécies de *Vibrio* apresentam aumento do crescimento e viabilidade na presença das catecolaminas (Lyte & Ernst, 1992; Lyte, 1993; O'Donnell et al., 2006; Nakano et al., 2007; Cogan et al., 2007). As catecolaminas já foram relacionadas também ao aumento da virulência bacteriana, promovendo um aumento da motilidade e capacidade de invasão celular (Cogan et al., 2007) e aumentando a expressão de fatores de virulência, estresse oxidativo e fatores relacionadas a aquisição de ferro (Dowd, 2007; Karavolos et al., 2008).

Estes estudos fornecem fortes evidências que hormônios liberados durante o estresse possam ter ações diretas sobre bactérias, tanto na etiologia como na patogenicidade de doenças infecciosas. Porém pouco se sabe sobre os efeitos destas substâncias sobre o crescimento de patógenos periodontais (Roberts et al.,

2002). Estudo realizado por Roberts et al. (2002), investigaram os efeitos das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) em 43 patógenos subgengivais in vitro, demonstraram que as catecolaminas podem ter influência no crescimento de forma espécie-dependente, aumentando ou reduzindo o desenvolvimento bacteriano. Nesse trabalho, a espécie *P. gingivalis* apresentou uma redução do crescimento quando exposta às catecolaminas. Dados na literatura científica sobre os efeitos dos hormônios relacionados ao estresse nessa bactéria ainda são escassos e conflitantes.

Existem relatos na literatura de que as catecolaminas e o cortisol não são capazes de alterar a viabilidade de suas células planctônicas e nem do seu biofilme (Belay et al., 2003). Em contraste, outros achados mostram que a noradrenalina pode causar leve redução do crescimento de *P. gingivalis* (Roberts et al., 2002, 2005; Saito et al., 2011) e que o cortisol poderia promover um estímulo do crescimento nessa bactéria (Akcali et al., 2013). Recentemente foi mostrado que a noradrenalina pode causar aumento da virulência de *P. gingivalis* através do aumento da produção da gingipaína RgpB, uma importante protease dessa bactéria relacionada a sua ação de destruição do tecido periodontal e da sua capacidade de invasão celular (Saito et al., 2011).

Considerando esses fatos, é possível que haja um efeito sinérgico dos hormônios relacionados ao estresse sobre a resposta do hospedeiro e sobre a virulência bacteriana. Dessa forma, se faz necessário pesquisar as possíveis alterações que as catecolaminas e o cortisol podem causar sobre o padrão de crescimento e virulência de *P. gingivalis*. Esse estudo contribuirá para o entendimento futuro da relação entre as patologias periodontais e o estresse, além

de poder elucidar possíveis mecanismos de adaptação de *P. gingivalis* na presença das catecolaminas e do cortisol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL E A PREVALÊNCIA DE *P. GINGIVALIS* NA PERIODONTITE CRÔNICA

A doença periodontal é uma doença multifatorial, caracterizada como uma inflamação dos tecidos de suporte dos dentes causada pelo acúmulo do biofilme dental, podendo levar à perda de inserção conjuntiva, osso alveolar e de cemento radicular (Brown et al., 1989; Lindhe, 2005). As primeiras manifestações do tecido periodontal frente à presença do biofilme dental são inflamatórias e imunológicas a fim de proteger os tecidos gengivais da invasão microbiana. Dependendo da severidade da lesão tecidual causada pelas reações de defesa do hospedeiro, pode-se observar a gengivite (restrito ao tecido gengival) e a periodontite (quando atinge os tecidos de suporte), caracterizada por infiltração de leucócitos, perda de tecido conjuntivo, reabsorção de osso alveolar e formação de bolsa periodontal (Lindhe, 2005).

Segundo a Academia Americana de Periodontologia (1999), as doenças que envolvem a gengiva e o periodonto são classificadas, resumidamente, em doenças gengivais, periodontite crônica e periodontite agressiva. Na periodontite crônica predominam bactérias gram-negativas e anaeróbias. Entre os microorganismos conhecidos como patógenos periodontais está a espécie *Porphyromonas gingivalis*, que é um bacilo gram-negativo não fermentador de carboidratos, anaeróbio estrito e que utiliza ferro na forma de hemina para promover

seu crescimento (Lamont & Jenkinson, 1998; Yang et al., 2004; Bostanci & Belibasakis, 2012).

Estudos realizados por Beck et al. (1992) avaliaram a prevalência de patógenos periodontais em 366 indivíduos negros e 297 caucasianos idosos residentes em cinco municípios da Carolina do Norte. Amostras de fluido subgengival foram coletadas dos quatro primeiros molares de cada indivíduo com cones papel absorvente. Foi observado uma maior prevalência de *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite crônica com perda de inserção maior de 6mm em ambos os grupos étnicos.

Griffen et al. (1998) compararam a prevalência de *P. gingivalis* em um grupo de indivíduos com periodontite crônica e um grupo de indivíduos saudáveis. A detecção dos patógenos foi realizada com PCR convencional. *P. gingivalis* foi detectada em apenas 25% (46 de 181) dos indivíduos saudáveis, sendo detectada em 79% (103 de 130) dos indivíduos com periodontite crônica ($p < 0,0001$). Os resultados mostraram que os indivíduos com periodontite crônica apresentaram uma maior prevalência de *P. gingivalis*, pois a mesma apresentou-se 11,2 vezes maior do que no grupo saudável. Os dados confirmaram a hipótese que a *P. gingivalis* está intimamente relacionada à patogenicidade da doença periodontal uma vez que esta foi encontrada mais habitualmente em indivíduos com periodontite e raramente em indivíduos saudáveis.

Yano-Higuchi et al. (2000) estudaram a prevalência dos patógenos: *Tannerella forsythia*, *P. gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em amostras de biofilme subgengival de 21 indivíduos adultos com periodontite crônica, oito indivíduos com periodontite agressiva e 15 indivíduos saudáveis, no Japão. Em

relação à *P. gingivalis*, a prevalência dessa bactéria foi de 0% no grupo saudável, de 18,8% em indivíduos com periodontite crônica e em 16,2% em indivíduos com periodontite agressiva. O estudo concluiu, que a proporção de *T. forsythia* e *P. gingivalis* encontradas estavam significativamente correlacionados com os parâmetros clínicos, sugerindo que *T. forsythia* e *P. gingivalis* estão intimamente relacionados com doença periodontal na população japonesa.

Van Winkelhoff et al. (2002) compararam a prevalência e as proporções de bactérias periodontais em pacientes com periodontite e pacientes saudáveis com ou sem gengivite. O estudo foi realizado com 116 pacientes com diagnóstico de periodontite moderada a severa, com média de idade de 42,4 anos, e mais 94 pacientes sem diagnóstico de periodontite, com média de idade de 40,4 anos. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *T. forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra* foram significativamente mais prevalentes nos pacientes com periodontite do que nos controles. As maiores proporções foram de *P. gingivalis* e *T. forsythia* - 12,3 e 10,4%, respectivamente. Os autores concluíram que *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* e *P. micra* são todos os marcadores significativos para doença periodontal em indivíduos adultos e *P. gingivalis* e *T. forsythia* são os mais fortes marcadores para esta doença.

Querido et al. (2004) realizaram a quantificação de patógenos periodontais em 35 indivíduos com periodontite, sendo 16 do gênero feminino (45,8%) e 19 do gênero masculino (54,3%), de 26 a 60 anos de idade (40,7±9,1). Amostras de fluidos gengivais foram coletadas de bolsas periodontais profundas antes e após tratamento. Cento e quarenta sítios selecionados foram submetidos

aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular. A presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum subsp. nucleatum* e *F. nucleatum subsp. vincentii* foram avaliados previamente à terapia e após 120 dias do tratamento. Os resultados mostraram que *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *F. nucleatum subsp. vincentii* apresentaram redução estatisticamente significativa após a terapia de raspagem periodontal.

Wara-aswapati et al. (2009) investigaram as características microbiológicas da periodontite crônica em 20 indivíduos saudáveis, 20 indivíduos com periodontite crônica leve, e 20 indivíduos com periodontite moderada a severa na Tailândia. Amostras de placa subgengival foram coletadas e examinadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) a fim de identificar *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Treponema denticola* e *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados mostraram que indivíduos com periodontite moderada e severa, apresentaram uma alta prevalência de *P. gingivalis* (95%), *T. forsythia* (95%), *T. denticola* (80%). O estudo concluiu que a presença de patógenos periodontais como a *P. gingivalis* está intimamente associada com a gravidade da doença periodontal, principalmente com as formas crônicas da doença.

2.2 *P. GINGIVALIS*, SUAS CARACTERÍSTICAS E SEU PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

P. gingivalis, uma bactéria gram-negativa anaeróbia estrita, pigmentada de preto, é um dos principais agentes etiológicos no desenvolvimento e progressão da periodontite crônica (Goulbourne & Ellen, 1991; Beck et al., 1992; Lamont et al., 1992; Yao et al., 1996; Bostanci & Belibasakis, 2012). Não fermentador de carboidratos, esse micro-organismo utiliza ferro na forma de hemina para promover o seu crescimento (Lamont & Jenkinson, 1998).

No biofilme subgingival, *P. gingivalis* atua como um colonizador tardio, um processo facilitado por outras espécies de micro-organismos que colonizam primariamente o biofilme, provendo um ambiente mais adequado para a adesão, suprindo com substratos para o crescimento e reduzindo a tensão de oxigênio para valores adequados para o crescimento de *P. gingivalis*.

Entre os micro-organismos em que *P. gingivalis* se adere estão os colonizadores primários como os estreptococos orais (Lamont et al., 1992), *Actinomyces naeslundii* (Goulbourne & Ellen, 1991) e os colonizadores tardios como *F. nucleatum* (Kinder & Holt, 1989), *T. denticola* (Grenier, 1992) e *T. forsythia* (Yao et al., 1996). *P. gingivalis* tem sido extensivamente estudada, inclusive o genoma de uma cepa, a W83, já foi completamente sequenciado (Nelson et al., 2003). *P. gingivalis* pode aparecer em superfícies da cavidade oral como a mucosa oral, a língua, o palato, o esmalte, a placa dentária supragengival e está presente preferencialmente na região subgingival (Guentsch et al., 2009).

Essa bactéria produz uma ampla gama de fatores de virulência podendo estar envolvidos na colonização de tecidos e destruição, bem como na redução da resposta de defesa do hospedeiro (Holt et al., 1999). *P. gingivalis* está em contato estreito com o epitélio em bolsas periodontais in vivo (Noiri et al., 1997), podendo invadir várias linhagens de células, incluindo células epiteliais (Sandros et al., 1994), células endoteliais (Rudney et al., 2001) e fibroblastos (Amornchat et al., 2003).

P. gingivalis adere e invade as células gengivais, resultando no desequilíbrio da homeostase do tecido e da integridade estrutural e funcional das células epiteliais da gengiva, podendo contribuir para a persistência bacteriana e a progressão das manifestações crônicas da doença periodontal (Quirynen et al., 2001). Essa invasão às células epiteliais é considerada como um fator essencial para a colonização das bolsas periodontais e para o início, progressão e severidade da periodontite (Pathirana et al., 2007). Após a invasão, esses micro-organismos mantêm sua viabilidade celular, expandindo a colonização em outras células epiteliais, o que permite sua sobrevivência na cavidade oral (Xia et al., 2007). Além de se manter viável no interior das células epiteliais, *P. gingivalis* modula a resposta inflamatória dessas células, com um aumento da produção de citocinas inflamatórias como a IL-8, IL-1, IL-6 e TNF α , o que pode contribuir para a manutenção de uma infecção crônica (Eick et al., 2006).

P. gingivalis pode aderir a uma variedade de componentes de superfície que reveste a cavidade oral, sendo essa a adesão mediada por componentes bacterianos como as fímbrias, hemaglutininas e proteinases (Okuda, 1993), entre elas a gingipaína arginina específica (gingipaína A e B [RgpA e RgpB, respectivamente]) e gingipaína cisteína específica (Lys-gingipain [KGP]) (Sheets et

al., 2005). Esses fatores de adesão são capazes de se ligar especificamente a componentes que revestem a cavidade bucal, tais como proteínas salivares, bactérias comensais, vários tipos de matrizes extracelulares, e células do hospedeiro, incluindo fibroblastos gengivais, células epiteliais e células endoteliais (Papapanou et al., 1994; Sandros et al., 1994; Dorn et al., 2000; Lamont & Yilmaz, 2001; Yilmaz et al., 2004; Bostanci & Belibasakis, 2012). Essas habilidades adesivas são consideradas como um traço patogênico que causa grande destruição periodontal.

As gingipaínas são as proteases produzidas por *P. gingivalis*, as mais estudadas e melhor caracterizadas (Fitzpatrick et al., 2009). As gingipaínas são especificadas como gingipaína K e *gingipaína* R e são capazes de hidrolisar ligações peptídicas de Lis-Xaa ou Arg-Xaa, respectivamente (Potempa et al., 1995). Entre as gingipaínas R, estão a HRgpA e a RgpB, produtos de dois genes distintos porém relacionados, os genes *rgpA* e *rgpB*. A gingipaína K, ou Kgp, é um produto específico do gene *kgp* (Imamura, 2003). As gingipaínas RgpA e RgpB, estão envolvidas na adesão às células epiteliais, através de ligação aos receptores celulares pelos domínios catalíticos dessas proteinases (Chen & Duncan, 2004). Por causa de sua atividade proteolítica, as gingipaínas são capazes de degradar proteínas do hospedeiro, como o colágeno, fibronectina, imunoglobulina G e TNF- α (Potempa et al., 2000; Guo et al., 2010).

Uma vez estabelecido na cavidade oral, esse micro-organismo deve adquirir nutrientes para o crescimento e neutralizar as defesas do hospedeiro para iniciar um processo de infecção. Sendo assim, as gingipaínas são os principais fatores de virulência de *P. gingivalis* porque são essenciais em todas as etapas da

infecção: adesão e colonização, nutrição e aquisição, a evasão de defesas do hospedeiro e invasão tecidual (Grenier & La, 2011; Bostanci & Belibasakis, 2012). Dessa forma, as proteases de *P. gingivalis* participam na patogênese da periodontite de diferentes formas: na aquisição de peptídeos, aminoácidos e de ferro, que auxiliam no crescimento bacteriano, funcionando como receptores de exposição e contribuindo com a adesão por meio das fímbrias; na degradação de imunoglobulinas, de proteínas do complemento e clivagem de receptores de macrófagos, neutralizando as defesas do hospedeiro; na degradação ou indução de citocinas e degradação de receptores de células superficiais, modulando a resposta inflamatória do hospedeiro; na degradação de proteínas de tecido, estimulação de metaloproteinases, inativação de inibidores de protease, responsáveis pela destruição tecidual (Grenier & La, 2011).

2.3 A RELAÇÃO DO ESTRESSE COMO FATOR DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DAS PERIODONTITES

Os patógenos por si só não são capazes de desenvolver todo o processo patológico envolvido na periodontite. São vários os fatores considerados de risco para instalação das doenças periodontais, entre eles o tabagismo (McGuire & Nunn, 1996), o diabetes mellitus (Papapanou & Lindhe, 1999; Van Dyke & Van Winkelhoff, 2013) e a associação de alguns tipos de micro-organismos específicos os quais podem interferir na condição periodontal, favorecendo o desenvolvimento das periodontites (Peruzzo et al., 2008). Partos pré-maturos (Offenbacher et al., 1998),

artrite reumatoide (Mercado et al., 2003; Pischon et al., 2008; Linden et al., 2013), infecções respiratórias (Scannapieco & Genco, 1999; Linden et al., 2013), obesidade (Saito et al., 2008; Sarlatti et al., 2008; Linden et al., 2013), doenças cardiovasculares (Tonetti et al., 2013), também têm sido associadas às doenças periodontais. Outros fatores como estresse, ansiedade, depressão apesar de não serem considerados fatores de risco absoluto podem interferir na condição periodontal em indivíduos com periodontites. O estresse tem sido mencionado como possível fator participante na patogênese da doença periodontal (Genco et al., 1999; Vettore et al., 2003; Johannsen et al., 2005; Ng & Leung, 2006; Peruzzo et al., 2008; Akcali et al., 2013).

Genco et al. (1999) observaram a associação de estresse, angústia e depressão e parâmetros clínicos periodontais através de um estudo transversal em 1.426 indivíduos de 25 a 74 anos. Os indivíduos da pesquisa responderam a cinco questionários psicossociais onde foram mensuradas situações de estresse crônico psicossocial. Os parâmetros clínicos periodontais avaliados foram: presença de placa bacteriana supragengival, sangramento gengival, presença de cálculo subgengival, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica periodontal, e radiografias periapicais. Os resultados mostraram que indivíduos com estresse psicossociais associados com a tensão financeira, angústia, e depressão, apresentaram uma maior predisposição para desenvolver doença periodontal, pois apresentaram uma maior perda de inserção clínica periodontal e perda óssea alveolar do aqueles considerados com baixos níveis de estresse psicossocial, podendo desta forma sugerir que o estresse crônico possa ser um indicador de risco para doença periodontal.

Vettore et al. (2003) investigaram a relação entre o estresse, ansiedade e periodontite crônica em setenta e nove pacientes (idade média de 46,8 +/- 8 anos) divididos em três grupos de acordo com níveis de profundidade à sondagem (PS): grupo controle (PS < ou = 3mm, n=22), grupo de teste 1 (pelo menos quatro sítios com PS > ou = 4mm e <6mm, n=27) e grupo de teste 2 (pelo menos quatro sítios com PS mm > 6, n=30). A mensuração do estresse se deu por meio de questionários. Os parâmetros periodontais foram avaliados pelo índice gengival, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. Os autores concluíram que o estresse pode estar associado ao agravamento de sinais clínicos da doença periodontal como profundidade de sondagem moderada e perda de inserção clínica, além da redução da resposta do paciente aos tratamentos periodontais não cirúrgicos.

Johansen et al. (2006) investigaram a condição periodontal, comparando com a condição de saúde bucal, marcadores pró-inflamatórios e cortisol no fluido gengival e saliva em indivíduos com estresse emocional. Foram avaliados 43 indivíduos com estresse sendo o grupo teste do gênero feminino idade 42,0 ($\pm 9,3$ DP) anos, e 29 do grupo controle com média de idade 54,5 ($\pm 2,9$) anos. Os parâmetros periodontais avaliados foram: avaliação de placa visível, índice de inflamação gengival (IG), sangramento a sondagem clínica (SS), profundidade de sondagem (PS), e nível de inserção clínica (NIC). Para avaliação dos marcadores pró-inflamatórios e cortisol, foram coletados fluidos subgengivais de quatro dentes de cada indivíduo da pesquisa. Os resultados mostraram uma quantidade de placa mais significativa no grupo teste, comparados aos controles ($p < 0,003$). Os indivíduos com doença apresentaram uma média de IG 1,53 ($\pm 0,13$) em comparação com 0,89 ($\pm 0,10$) para os indivíduos saudáveis ($p < 0,001$). Os autores do estudo sugeriram que

o estresse pode interferir na resposta imunológica do indivíduo favorecendo o agravamento das doenças periodontais, podendo estar relacionadas ao alto índice de cortisol encontrado na saliva de mulheres com estresse emocional.

Ng & Leung (2006) avaliaram a relação entre a doença periodontal e estresse psicossocial em um estudo transversal em 1000 indivíduos entre 25-64 anos, onde os participantes da pesquisa responderam à questionários pré-estruturados para a mensuração do estresse. Os parâmetros periodontais foram realizados pelo nível de inserção clínica periodontal. Os autores observaram que os indivíduos com depressão, ansiedade e estresse, apresentaram uma maior incidência de perda de inserção clínica periodontal, sugerindo que o estresse pode ser considerado um significativo indicador de risco para o aumento da severidade das doenças periodontais.

Peruzzo et al. (2007) observaram em uma revisão da literatura que 57.1% dos estudos encontraram uma relação positiva entre estresse/fatores psicossociais e doença periodontal; 28.5% dos estudos relataram uma relação positiva relacionadas apenas à alguns fatores psicossociais; enquanto, que apenas 14,2% dos estudos não encontraram qualquer relação entre o estresse e o desenvolvimento e severidade das periodontites.

Ainda, Peruzzo et al. (2008), em um estudo conduzido em ratos, observaram que o estresse crônico pode afetar, de forma significativa, a perda óssea em sítios com doença periodontal. A inflamação produzida pela ligadura associada à condição de estresse, elevou os níveis de catecolaminas, que por sua vez, aumentou significativamente os níveis de RNAm de IL-1beta, IL-10, IFN- γ e RANKL. Dessa forma, o estresse foi apontado como um importante fator na etiologia e

manutenção da doença periodontal, indicando que o estresse pode modular a destruição óssea.

Akali et al. (2013) realizaram um levantamento da literatura sobre marcadores biológicos do estresse e a relação com as doenças periodontais. Os autores afirmaram que, durante o estresse o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é ativado durante estímulos estressores de origem psicológica, comportamental ou fisiológica. Como consequência desse estímulo, algumas substâncias como adrenalina, noradrenalina, cortisol, alfa amilase salivar, cromogranina A e neuropeptídeos podem ser liberados nos fluidos corporais, entre eles, a saliva. Vários desses marcadores de estresse são encontrados no sangue e na saliva em pacientes com doenças periodontais e podem influenciar de forma negativa o desenvolvimento da doença periodontal por diferentes mecanismos, incluindo modificações da resposta inflamatória e as alterações na composição dos biofilmes microbianos orais.

Semenoff et al. (2013) investigaram o efeito do estresse crônico em ratos com periodontite induzida por ligadura. Após o nascimento, os filhotes foram alocados em dois grupos. Vinte e quatro ratos recém-nascidos permaneceram com suas mães por 20 dias e outros 24 ratos foram afastados de suas mães todos os dias durante quatro horas durante a amamentação por 20 dias (grupo submetido ao estresse). Após esse período, quando os ratos atingiram por volta de 250g, todos os animais receberam ligaduras nos segundos molares maxilares (grupo LG- ligadura e grupo SLG – ligadura e estresse). Após 15 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e os maxilares foram removidos. As radiografias foram tiradas e reveladas e foram utilizados para a análise de destruição óssea. Os resultados revelaram que

o grupo SLG apresentou maior perda óssea em relação ao grupo LG ($p < 0,05$). A exposição ao estresse crônico imposta aos descendentes produziram uma maior progressão da perda óssea induzida durante a idade adulta.

Os mecanismos pelos quais o estresse influencia na progressão das doenças inflamatórias e infecciosas ainda não foram totalmente esclarecidos. Apesar de grande parte das pesquisas estudarem a interação entre modulação neuroendócrina e resposta do hospedeiro (Cohen & Williamson, 1991; Peruzzo et al., 2008; Hironaka et al., 2008), alguns estudos têm reconhecido que micro-organismos potencialmente patogênicos podem ser influenciados de alguma forma por substâncias neuroendócrinas (Lyte, 1993; Roberts et al., 2005; O'Donnell et al., 2006; Karavolos et al., 2008).

2.4 AS CATECOLAMINAS E A RELAÇÃO COM OS MICRO-ORGANISMOS

O estresse psicológico e físico pode ativar o sistema hipotálamo-hipófise-adrenal, provocando a liberação de altos níveis de hormônios glicocorticóides e catecolaminas na circulação sanguínea (Yang & Glaser, 2002). Durante o estresse, a liberação de catecolaminas pode aumentar em até 10 vezes (Cryer, 1980).

As catecolaminas são liberadas pelo sistema nervoso periférico e a medula supra-renal, atuando na regulação de grande parte das funções fisiológicas, principalmente na integração das respostas a uma diversidade de fatores estressantes que comprometem os mecanismos homeostáticos. Dentre as catecolaminas podemos destacar duas: adrenalina e noradrenalina. A epinefrina ou

adrenalina é o principal hormônio secretado pela medula supra-renal nos mamíferos, sendo um potente estimulador dos receptores α e β -adrenérgicos, possuindo efeitos extremamente complexos sobre os seus órgãos-alvo. Já a norepinefrina ou noradrenalina é o principal neurotransmissor liberado pelos nervos adrenérgicos pós-ganglionares dos mamíferos (Googman & Gilman, 2005). Tem sido reportado que essas substâncias, cuja liberação aumenta durante respostas ao estresse, têm profundos efeitos no desenvolvimento de doenças infecciosas e no crescimento e expressão de virulência de alguns patógenos. O estresse pode além da liberação das catecolaminas, estimular a liberação de glicocorticoides, dentre estes o cortisol é o mais representativo. O cortisol tem um importante papel na defesa imunológica do organismo, agindo como um anti-inflamatório e imunossupressor (Marques & Sternberg, 2004).

Diversos estudos já demonstraram a relação existente entre a microbiologia e a neurofisiologia, principalmente em relação aos efeitos do estresse no aparecimento de infecções (Freestone et al., 2008; Sarlatti et al., 2008). Em estudo desenvolvido por Benedict & Grahame-Smith (1978) foi observado que pacientes que desenvolveram septicemia pós-operatória apresentaram níveis mais elevados de catecolaminas plasmáticas do que pacientes não infectados.

Durante a infecção, as bactérias podem responder ativamente aos hormônios de mamíferos, que se elevam de forma significativa após o estresse (Freestone et al., 2008), cuja resposta fornece uma ponte importante entre as doenças infecciosas e stress, e induz ao conceito de "endocrinologia microbiana" (Lyte, 1993, 2004; Everest, 2007). As catecolaminas dopamina, adrenalina e noradrenalina, os quais são todos derivados de tirosina, estão amplamente

distribuídos em tecidos animais, como hormônios e neurotransmissores relacionados ao estresse. Durante o estresse, o sistema hipotálamo provoca uma rápida liberação de adrenalina no plasma a partir da medula supra-renal. A noradrenalina é libertada localmente a partir de terminações nervosas simpáticas periféricas, e também está presente na corrente sanguínea.

Descobriu-se que os fagócitos (incluindo neutrófilos, macrófagos e células polimorfonucleares de sangue) sintetizam e liberam catecolaminas (Flierl et al., 2007). Estudos de Endocrinologia microbiana têm revelado que as catecolaminas não só desempenham um papel essencial em estresse e respostas imunes, mas também desencadeiam respostas do patógeno. Um dos efeitos das catecolaminas em bactérias é o de estimular o crescimento, facilitando a remoção do ferro a partir de proteínas bacterianas hospedeiras de ligação de ferro (Freestone et al., 2000; Burton et al., 2002; Anderson & Armstrong, 2008).

Ainda, associação entre altas concentrações de noradrenalina e elevado crescimento de *Escherichia coli* foram observados em intestino de animais após sofrerem experiência traumática (Jones et al., 1988; Lyte & Bailey, 1997).

Com o intuito de entender a relação entre as doenças infecciosas e o estresse, estudos têm-se centrado sobre os efeitos diretos das catecolaminas na patogenicidade e crescimento bacteriano. Em relação ao crescimento bacteriano, a noradrenalina e a adrenalina apresentam diferentes efeitos, geralmente de acordo com a espécie em estudo. Ambas as catecolaminas podem induzir o crescimento de micro-organismos entéricos como *E. coli* (Lyte & Ernst, 1992; Lyte, 1993) e *Campylobacter jejuni* (Cogan et al., 2007) e de bactérias orais como *A. naeslundii*, *Actinomyces gerencsariae*, *Eikenella corrodens* e *Campylobacter gracilis* (Roberts

et al., 2002). Já a noradrenalina pode induzir o crescimento dos micro-organismos *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella sonnei* e *Staphylococcus aureus* (O'Donnell et al., 2006).

As catecolaminas, ao invés de estimular, podem também diminuir o crescimento bacteriano. Os micro-organismos orais, *A. israelii*, *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga Ochracea*, *F. nucleatum* e *Veillonella parvula*, tiveram seu crescimento reduzido tanto na presença da adrenalina como na da noradrenalina. Já o micro-organismo *C. gracilis* apresentou aumento no crescimento na presença da noradrenalina e redução na presença da adrenalina (Roberts et al., 2005). Enquanto que micro-organismos entéricos como *Enterobacter* sp., *Salmonella choleraesuis* subsp choleraesuis serotype Typhi, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei* não tiveram seu crescimento afetado na presença de catecolaminas (Belay et al., 2003).

Está bem estabelecido que o crescimento e colonização de *P. gingivalis* nos tecidos orais são dependentes de sua capacidade de obtenção de ferro (Roper et al., 2000; Nelson et al., 2003; Olczk et al., 2005) e, portanto a substância hemina é uma fonte importante do grupo heme e de ferro para o crescimento in vitro. A vitamina K (menadiona) é um importante fator de crescimento bacteriano cujo papel celular ainda não foi totalmente elucidado (Hojo et al., 2007). Alguns estudos têm demonstrado que as catecolaminas são capazes de estimular o crescimento bacteriano e que esse parece estar associado à capacidade da noradrenalina e adrenalina em facilitar a captação de ferro por diferentes espécies bacterianas (O'Donnell et al., 2006; Nakano et al., 2007; Anderson & Armstrong, 2008). Um estudo feito por Roberts et al. (2005) demonstrou que o efeito das catecolaminas,

em 43 micro-organismos que compõe o biofilme subgengival, está envolvido com o aumento pela captação de ferro ou pela estimulação da produção de fatores auto-indutores de crescimento.

Além de interferir no crescimento bacteriano, a adrenalina e a noradrenalina podem produzir alterações na expressão gênica e na virulência. A noradrenalina pode afetar a transcrição gênica do patógeno entérico *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, induzindo a expressão de genes relacionados ao transporte de metais e também do gene *oxyR*, responsável pela regulação da resposta ao estresse oxidativo (Karavolos et al., 2008).

Essas catecolaminas também já mostraram efeitos sobre a motilidade, formação de biofilme, expressão gênica e colonização de células HeLa por *E. coli* (Bansal et al., 2007). Além disso, a noradrenalina é capaz de induzir genes responsáveis pela expressão de toxinas (*stx1*, *stx2*) e de proteínas de aderência bacteriana (*eae*) dessa mesma espécie bacteriana (Dowd, 2007). A motilidade e capacidade de invasão às células epiteliais de *C. jejuni* também são aumentados na presença de noradrenalina (Lyte & Ernst, 1992).

Dessa forma, esses estudos mostram que essas substâncias podem causar alterações significantes no desenvolvimento, colonização e potencial patogênico bacteriano. Embora o estresse tenha sido sugerido como um importante fator no desenvolvimento das manifestações periodontais em indivíduos com periodontite (Cohen & Williamson, 1991; Hilgert et al., 2006; Ng & Leung, 2006; Ishisaka et al., 2007, 2008; Peruzzo et al., 2008; Akcali & Huck, 2013), poucos estudos se voltaram para os efeitos e mecanismos dos hormônios do estresse sobre

as doenças periodontais, em especial sobre a ação desses nos patógenos periodontais.

Em relação à *P. gingivalis*, existem relatos na literatura de que as catecolaminas não são capazes de alterar a viabilidade de suas células planctônicas e nem do seu biofilme, como verificado por Belay et al. (2003) e Jentsch et al. (2013). Em contraste, outros achados mostram que a noradrenalina pode causar redução leve do crescimento de *P. gingivalis* (Roberts et al., 2002, 2005; Saito et al., 2011). Além disso, o cortisol foi apontado como um hormônio que causa estimulação do crescimento de *P. gingivalis*, sem ser metabolizado por essa bactéria (Akcali et al., 2013).

Roberts et al. (2002) observaram em um estudo sobre o crescimento em 43 patógenos, mostrando uma ampla variação na respostas ao crescimento na presença de noradrenalina ou adrenalina. Das bactérias orais estudadas, cerca de metade das espécies mostrou significativa melhoria do crescimento ou inibição na presença das catecolaminas, indicando que hormônios liberados durante a resposta ao estresse podem modular diretamente o crescimento e a composição do biofilme subgingival. Os resultados indicaram que os níveis de catecolaminas pode provocar uma mudança no equilíbrio das espécies subgingivais, podendo influenciar o seu crescimento e na expressão de virulência. Em outro estudo por esses autores, foi demonstrado que os efeitos das catecolaminas podem estar relacionados ao aumento da captação de ferro ou pela estimulação da produção de fatores auto-indutores de crescimento (Roberts et al., 2005). Foi demonstrado que *P. gingivalis* e *T. forsythia*, ambas importantes no processo de desenvolvimento e instalação da doença periodontal, podem ter seu crescimento levemente reduzido na presença de

noradrenalina (Roberts et al., 2002, 2005). Como proposto por esses mesmos autores, o fato de que as catecolaminas possam afetar negativamente o crescimento desses micro-organismos, não descarta a possibilidade das mesmas influenciarem na expressão gênica, inclusive aumentando a produção de seus fatores de virulência (Roberts et al., 2005).

Recentemente um estudo realizado por Saito et al. (2011) foram avaliados os efeitos da noradrenalina em cepas de *P. gingivalis* FDC 381, onde as mesmas foram incubadas na presença ou ausência de noradrenalina em diferentes tempos de incubação, sendo que posteriormente foi verificada a expressão gênica relacionada a atividade proteolítica da bactéria, pelo ensaio de produção de gingipaínas, pela técnica RT-PCR. Os resultados mostraram que a noradrenalina aumentou a expressão do gene *RgpB*, uma gingipaína que desempenha um importante papel na virulência da *P. gingivalis*, sugerindo que noradrenalina pode influenciar no desenvolvimento da *P. gingivalis*, tornando-a mais virulenta.

Jentsch et al. (2013) avaliaram os efeitos dos hormônios do estresse (catecolaminas: adrenalina, noradrenalina, dopamina e hidrocortisona: cortisol) sobre o crescimento de quatro anaeróbios de espécies de bactérias anaeróbias relacionadas à periodontite (*F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia*) e uma espécie anaeróbio facultativo (*Eikenella corrodens*). O crescimento bacteriano foi determinado por dois métodos diferentes: hibridização fluorescente in situ (FISH), e a contagem de viáveis pelo método de cultura. Para simular o estresse, cada cepa foi cultivada em um especial meio de crescimento com três concentrações diferentes de cada hormônio. Os resultados revelaram que as bactérias tiveram seu crescimento aumentado, umas mais que outras, na presença dos hormônios do

estresse. Diferentes hormônios têm um diferente efeito sobre o crescimento de bactérias periodontite relacionadas in vitro. No entanto, *P. gingivalis* não sofreu nenhuma alteração no crescimento em nenhuma das concentrações e hormônios testados.

Dessa forma, se faz necessário pesquisar as possíveis alterações que as catecolaminas e o cortisol possam causar sobre o crescimento, sensibilidade aos antimicrobianos e padrão de transcrição de *P. gingivalis*, principalmente em relação aos genes responsáveis pela produção de fatores de virulência e pela resposta ao estresse oxidativo. Esse estudo é uma forma de contribuir para o entendimento da relação entre as patologias periodontais e estas substâncias, além de poder elucidar possíveis mecanismos de adaptação de *P. gingivalis* na presença das catecolaminas.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da adrenalina, noradrenalina e cortisol sobre o crescimento, viabilidade, susceptibilidade antimicrobiana e virulência de *Porphyromonas gingivalis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Verificar, por meio de testes de viabilidade bacteriana, possíveis alterações no crescimento de *P. gingivalis* na presença de noradrenalina, adrenalina e cortisol;

2- Verificar possíveis alterações na sensibilidade de *P. gingivalis* aos antimicrobianos, por meio do teste de sensibilidade ao metronidazol;

3- Avaliar os efeitos das catecolaminas e do cortisol sobre a expressão de genes do estresse oxidativo, metabolismo do ferro e genes de virulência de *P. gingivalis* por meio da técnica de qRT-PCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas para a avaliação de seus efeitos, as seguintes substâncias: adrenalina (bitartarato de (-)-adrenalina - Sigma Chemical Co - Poole, UK), noradrenalina (bitartarato de (-)-arterenol - Sigma Co) e cortisol (hidrocortisona - Sigma Co). As soluções de adrenalina, noradrenalina e cortisol foram feitas utilizando água destilada como solvente e foram filtradas com a utilização de filtros de poros de 0.22µm. Os grupos experimentais testados foram: grupos adrenalina, noradrenalina e cortisol (meio de cultura + bactéria + substância teste), grupo controle positivo (meio de cultura + bactéria), grupo controle negativo (meio de cultura + substância teste). A concentração de adrenalina, noradrenalina e cortisol utilizada nos experimentos foi de 100µM (Belay et al., 2003; Dowd, 2007; Karavolos et al., 2008).

4.2. AMOSTRA BACTERIANA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para esse estudo foi utilizada a bactéria *Porphyromonas gingivalis* W83. O crescimento e cultivo foram feitos sob condições anaeróbicas (10% CO₂, 10% H₂ e 80% N₂) utilizando uma câmara de anaerobiose (MiniMacs Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific, Shipley, UK) à 37°C. As culturas de *P. gingivalis* W83 foram

preparadas com meio TSB (Difco) com Extrato de Levedura a 2% para a cultura em tubos e para o cultivo em placas, em TSA (Difco) com 2% de Extrato de Levedura e 7% de sangue de carneiro desfibrinado, ambos acrescidos de 5µg/mL de hemina (Sigma Co.) e 1µg/mL de menadiona (Sigma Co.).

Para os experimentos foram utilizados dois tipos de meio de cultura:

1- Meio TSB - TSB (Difco) com Extrato de Levedura (Difco) a 2%, 5µg/mL de hemina e 1µg/mL de menadiona;

2- Meio SAPI - Meio mínimo SAPI-soro (serum-SAPI minimal medium), meio utilizado na tentativa de mimetizar as condições competitivas do meio ambiente que a bactéria encontra no fluido gengival e na bolsa periodontal (Lyte 1992; Roberts et al., 2002). O meio SAPI teve a seguinte composição: glicose 2,77mM; nitrato de amônio 6,25mM; fosfato de potássio 1,84mM; cloreto de potássio 3,35mM; sulfato de magnésio 1,01mM, ajustado para pH 7.5 e suplementado com 30% de soro bovino adulto, adicionados ou não de 5µg/mL de hemina e 1µg/mL de menadiona.

4.3 PADRONIZAÇÃO E PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

Para a escolha do valor do inóculo, foi consultado um trabalho semelhante ao presente estudo, onde também foi avaliado o crescimento de *P. gingivalis* na presença de catecolaminas (Roberts et al., 2002). Para a preparação do inóculo do presente trabalho foram utilizados tubos contendo 8mL de TSB com extrato de levedura, hemina e menadiona e culturas bacterianas com dois dias de crescimento em meio TSA com os suplementos mencionados anteriormente.

Colônias de bactéria das placas foram acrescidas ao tubo de inóculo até atingir o valor de 0,5 de absorbância, em comprimento de onda de 660nm. Após a obtenção do tubo de inóculo inicial, foi feita uma diluição seriada do mesmo, plaqueamento em meio ágar e incubação por cinco dias em anaerobiose. Posteriormente, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose e as unidades formadoras de colônias foram obtidas. Após o cálculo da média dos valores, foi constatado que os tubos de 0,5 de absorbância contêm em torno de $8,0 \times 10^6$ ufc/mL.

A fim de encontrar o volume de inóculo a ser colocado nos tubos experimentais, foram testados quatro volumes do inóculo inicial: 70µL, 100µL, 250µL e 500µL. Os diferentes volumes de inóculo bacteriano foram adicionados aos tubos contendo 6mL de meio de cultura TSB e SAPI. Os tubos foram incubados em anaerobiose e submetidos à espectrofotometria (medidas de absorbância, com comprimento de onda igual a 660nm) após 16, 20, 24, 28 e 40 horas para o meio TSB e 16, 24, 30 e 48h para o meio SAPI.

A partir dos resultados obtidos foi adotado o volume de 100µL tanto para os experimentos com meio SAPI, como para o meio TSB. Este volume de inóculo onde foi observado o melhor crescimento sem haver excesso de bactéria para a quantidade de meio de cultura no tubo. O perfil de crescimento utilizando o volume de 100µL de inóculo de 0,5 de absorbância está apresentado na seção *Resultados* do presente trabalho.

4.4 ENSAIOS DE SENSIBILIDADE DE *P. GINGIVALIS* W83 NA PRESENÇA DE ADRENALINA, NORADRENALINA E CORTISOL.

Nessa primeira etapa da pesquisa objetivou-se a verificação dos efeitos da adrenalina, da noradrenalina e do cortisol sobre o crescimento do micro-organismo *P. gingivalis* W83.

Como a intenção desse estudo era verificar o efeito dessas duas catecolaminas e do corticosteroide sobre o crescimento, foram adotados os dois cultivos mencionados no item 4.2, com o meio TSB e com o meio SAPI, analisando assim o efeito dessas substâncias sobre diferentes condições. Além disso, para cada condição foram realizados dois ensaios distintos como descritos a seguir:

4.4.1. Ensaios de sensibilidade de *P. gingivalis* W83 exposta às substâncias teste no tempo inicial de crescimento

Nessa etapa o micro-organismo pesquisado foi exposto a adrenalina, a noradrenalina e ao cortisol a partir do momento da inoculação (tempo de crescimento das culturas igual a zero, $T=0$), resultando em um contato com as substâncias testadas durante todo o período de crescimento. Para isso, as soluções foram preparadas e transferidas para tubos contendo os dois meios de cultura testados, o meio TSB/extrato de levedura com hemina e menadiona e o meio SAPI. Nesse ensaio em específico, além do meio SAPI acrescido de hemina e menadiona, também foi testado esse mesmo meio sem essas duas substâncias com o objetivo

de avaliar uma possível interferência das catecolaminas na aquisição de ferro pela bactéria.

Desse modo, a proposta de um meio de cultura sem hemina e menadiona para *P. gingivalis* tem como objetivo limitar a fonte de ferro para esse micro-organismo, a fim de verificar possíveis alterações relacionadas com a sua captação, quando exposto à adrenalina e noradrenalina. Nesse mesmo experimento, também não foi utilizada a menadiona, a fim de simular uma situação semelhante ao que ocorre in vivo.

Após a distribuição das soluções de adrenalina, noradrenalina e cortisol, o inóculo bacteriano foi preparado como descrito no item 4.2, e transferiu-se 100µL do mesmo nos tubos que deveriam conter a bactéria pesquisada. Todos os tubos foram mantidos em anaerobiose e após 24 e 48 horas foram submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro, com comprimento de onda igual a 660nm.

4.4.2 Ensaio de sensibilidade de *P. gingivalis* W83 exposta às substâncias teste na fase logarítmica de crescimento

Neste ensaio, ao contrário do anterior em que o micro-organismo ficou exposto a adrenalina, a noradrenalina e ao cortisol durante todo o período de crescimento, o contato com essas substâncias ocorreu somente após *P. gingivalis* W83 atingir o início da fase exponencial de crescimento. Para o meio TSB a exposição às catecolaminas e ao corticosteroide ocorreu após 16 horas de crescimento (T=16h), enquanto que para o meio SAPI esse contato ocorreu após 24

horas de crescimento (T=24h). Desse modo, após o inóculo bacteriano ser preparado conforme descrito no item 4.3, fez-se a transferência de 100µL para tubos contendo os devidos meios de cultura, ambos com hemina e menadiona. Os tubos foram incubados em anaerobiose até atingir o tempo de crescimento desejado, 16 horas para as culturas em TSB e 24 horas para as culturas em SAPI. Decorrido estes períodos, os tubos foram submetidos à leitura de absorbância em espectrofotômetro ($\lambda=660\text{nm}$), e as soluções de adrenalina, noradrenalina e cortisol preparadas e transferidas para as culturas que deveriam conter as substâncias pesquisadas. Feito isso, os tubos foram novamente incubados em anaerobiose por um período de 4 horas e então submetidos à leitura de absorbância em espectrofotômetro ($\lambda=660\text{nm}$). Assim, nesse ensaio o tempo de exposição da *P. gingivalis* W83 as catecolaminas e ao cortisol foi de 4 horas para todos os meios de cultura testados.

4.5 ENSAIO DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA AO METRONIDAZOL

Nesse experimento, foi avaliada a resposta apresentada pela *P. gingivalis* W83 ao antimicrobiano metronidazol, quando exposta a adrenalina, a noradrenalina e ao cortisol. Para esse ensaio as condições de meio de cultivo, preparação de inóculo e concentrações das catecolaminas e do corticosteroide são as mesmas dos ensaios anteriores. A solução de metronidazol foi filtrada em filtros de poros de 0,22µm de diâmetro.

Como o objetivo era verificar um possível efeito das substâncias testadas sobre a sensibilidade do micro-organismo ao metronidazol, a exposição à adrenalina, à noradrenalina e ao cortisol ocorreu por todo o período de crescimento bacteriano (T=0). Sendo assim, os grupos experimentais iniciais foram: grupos adrenalina, noradrenalina e cortisol (meio de cultura + bactéria + adrenalina ou noradrenalina ou cortisol), grupo controle positivo (meio de cultura + bactéria) e grupo controle negativo (meio de cultura + adrenalina ou noradrenalina ou cortisol). As soluções estudadas e o inóculo foram preparados e transferidos em tubos com meio de cultura e incubados em anaerobiose até atingirem o início da fase exponencial, 16 horas para as culturas em TSB (T=16h) e 24 horas para as culturas em SAPI (T=24h). Decorrido esse período, os tubos foram submetidos à leitura de absorbância em espectrofotômetro ($\lambda=660\text{nm}$) e uma alíquota de 10 μL foi coletada e inoculada em placas de Petri contendo meio de cultura TSA/extrato de levedura 2% com 7% de sangue de carneiro estéril desfibrinado, acrescido de hemina e menadiona.

Após a leitura em absorbância e a coleta da alíquota de 10 μL , a solução de metronidazol foi preparada e transferida para as culturas, atingindo uma concentração final de 0,06mg/mL. Desse modo, ao final desse processo os grupos experimentais passaram a ser: grupos adrenalina, noradrenalina e cortisol com metronidazol, grupo controle positivo com metronidazol, grupo controle positivo sem metronidazol e grupo controle negativo com e sem metronidazol. Os tubos retornaram para a anaerobiose onde permaneceram por mais uma hora e foram então submetidos a uma nova leitura. Posteriormente a leitura, novas alíquotas de 10 μL foram retiradas dos tubos e inoculadas em placas de Petri contendo meio de

cultura TSA/extrato de levedura 2% com 7% de sangue de carneiro desfibrinado, acrescido de hemina e menadiona. As placas foram incubadas em ambiente anaeróbio durante cinco dias e submetidas à contagem de colônias para calcular o número de unidades formadoras de colônia por mL.

4.6 EXTRAÇÃO DE RNA E PCR EM TEMPO REAL

A fim de verificar a expressão gênica de *P. gingivalis*, foi realizada a técnica RT-PCR em tempo real (qPCR). Os genes estudados foram os principais genes relacionados à virulência bacteriana, aquisição de ferro e ao estresse oxidativo.

Para a análise da expressão gênica a *P. gingivalis* W83 foi cultivada por 24 horas em meio SAPI com hemina (5µg/ml) e menadiona (1µg/ml), na presença e na ausência (grupo controle) das substâncias testes. Após esse período os tubos foram centrifugados a 10.000rpm por 10 minutos a 4°C, e as células lavadas com tampão PBS (Cloreto de sódio 80g/ml, Cloreto de potássio 2g/ml, Fosfato de potássio monobásico 2g/ml, Fosfato de sódio 11,5g/ml, pH=7,8) e submetidas a uma nova centrifugação. Ao final os pellets foram rapidamente congelados (-80°C) para posterior extração do RNA. Para a extração de RNA foi utilizado o kit Pure link RNA mini kit (Invitrogen®), segundo as instruções do fabricante.

Após a extração para determinar as concentrações e a pureza do RNA extraído foram feitas leituras (comprimento de onda de 260nm e 280nm) utilizando um espectrofotômetro (Nanodrop®, ThermoScientific).

Feita a quantificação do RNA, a DNase foi utilizada (DNase I amp grade – Invitrogen®) com o objetivo de reduzir as quantidades de DNA na amostra. Para isso, a cada 1µg de RNA, foi adicionado 1µL de tampão de reação 10x, 1µL de enzima DNase I e água DEPC qsp 10µL, e mantido 15 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido esse período adicionou-se 1µL de EDTA para inibir a ação da DNase, em seguida a solução foi aquecida no termociclador por 10 minutos a 65°C. Após o tratamento com a DNase, as amostras foram submetidas à uma nova quantificação utilizando o Nanodrop.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit SuperScript® III First- Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen®). Em um tubo de 0,2mL foram adicionados 100ng de RNA, 1µL de primers randômicos (Chia et al., 2001), 1µL de tampão de anelamento e água DEPC para um volume final de 10µL. A mistura foi submetida à temperatura de 65°C por cinco minutos e no gelo por um minuto. Em seguida adicionou-se 10µL de First-Strand Reaction Mix e 2µL de SuperScript® III/RNaseOUT Enzyme Mix. O volume total dos reagentes foi submetido ao ciclo térmico: 25°C/10min; 50°C/50min; 85°C/5 min e 4°C/1min.

Para avaliação da expressão gênica foi utilizada uma placa (TaqMan® Array Plates – Life Technologies®) confeccionada para o experimento contendo 29 genes em triplicatas (*feOB-1*; *feOB-2*; *hmuY*; *hmuR*; *ftn*; *tlr*; *tpx*; *oxyR*; *dps*; *rbr*; *sodB*; *ahpC*; *ahpF*; *hem*; *hagA*; *hagB*; *hagC*; *hagD*; *hagE*; *kgp*; *rgpA*; *rgpB*; *pepC*; *ptr*; *fimA*; *ragA*; *ragB*; 16S e PG 1357 como controles endógenos). Os genes avaliados estão apresentados no quadro a seguir:

Quadro 1 – genes avaliados por qRT-PCR

Classe funcional	Genes
Aquisição de Ferro e Hemina	<i>feOb-1, feOb-2, hmuY, hmuR, ftn, tlr</i>
Estresse Oxidativo	<i>oxyR, dps, rbr, sodB, ahpC, ahpF</i>
Proteólise, Hemólise e Adesão Celular	<i>hem, hagA, hagB, hagC, hagD, hagE, kgp, rgpA, rgpB, pepC, prt</i>
Componentes de Superfície	<i>fimA, ragA, ragB</i>
Genes referência	<i>16SrRNA</i>

Esse ensaio foi preparado pela empresa Life Technologies, que desenhou os primers para cada gene e testou a eficiência dos mesmos. Sendo assim, a empresa é detentora dos direitos do ensaio e, portanto não informa a sequência dos primers. O número de referência para esse ensaio é SO# 30193826.

A preparação do Mix do cDNA com o TaqMan Master Mix (Invitrogen), foi realizado segundo recomendações do fabricante. Foi utilizado 20µL para cada reação (10µL de amostra diluída e 10µL de TaqMan master mix). As condições dos ciclos foram: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, e finalmente 60°C por um minuto.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios realizados foram feitos com 10 replicatas e foram conduzidos em pelo menos em dois experimentos distintos.

Para a análise dos resultados foi primeiramente testada a normalidade dos dados obtidos e para este fim foi empregado o teste de Shapiro-Wilks. Como os

dados dos testes de sensibilidade às catecolaminas e ao cortisol apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA para a análise de variância, com o teste Dunnet como pós-teste. Já no teste de sensibilidade ao metronidazol, os dados apresentaram distribuição não normal, portanto, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis para as comparações. Todos os grupos teste (noradrenalina, adrenalina e cortisol) foram comparados com o grupo controle.

Para a avaliação da expressão gênica, foi utilizado o método do $\Delta\Delta Cq$ - Cq comparativo ($Cq = \text{quantification cycle}$; curva de quantificação ou curva *threshold* (CT)) onde o ΔCq de cada gene (valor do Cq do gene alvo menos o valor do Cq do gene referência) é comparado entre o grupo teste e o grupo controle. Para a análise estatística, foi utilizado um teste paramétrico de modo pareado fixo de realocação ao acaso descrito por Pfaffl et al. (2001, 2002), através do programa de análise estatística REST (REST 2009, Qiagen®). Esse programa leva em conta, além dos valores de Cq das amostras do grupo teste e controle, o valor da eficiência de cada gene durante a PCR. Por esse motivo, foi calculada a eficiência de cada gene previamente as análises de qPCR utilizando o método da curva padrão.

O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Desta forma quando o valor de $p \geq 0,05$ aceitou-se a hipótese H_0 , pelo qual se pode dizer não existir diferenças estatísticas entre os grupos. De forma oposta, quando $p < 0,05$, aceitou-se a hipótese alternativa em que se pode dizer que as diferenças entre os grupos não são ao acaso e sim diferenças reais. Com exceção das comparações dos dados obtidos na qPCR, todos os cálculos foram realizados com o software BioEstat versão 5.0 (Mamirauá/CNPq, Belém, PA, Brazil).

5 RESULTADOS

5.1 CRESCIMENTO DE *P. GINGIVALIS* NOS MEIOS TSB E SAPI

Os gráficos a seguir mostram o desenvolvimento de *P. gingivalis* em dois meios de cultura, TSB com hemina e menadiona – TSB-HM (figura 1) e SAPI com hemina e menadiona – SAPI-HM (figura 2). Em ambos os meios de cultura pode ser observado um crescimento bacteriano bastante satisfatório; no entanto, no meio SAPI o crescimento foi muito inferior em relação ao meio TSB. Esse resultado já era esperado, pois o meio SAPI apresenta-se pobre em nutrientes (Lyte & Ernst, 1992; Roberts et al., 2002) e foi utilizado no presente estudo com o intuito de mimetizar as condições in vivo da cavidade oral. O objetivo do presente teste não foi observar o crescimento total bacteriano até sua fase estacionária e, sim, observar um perfil geral do crescimento bacteriano até um período de 48 horas, período final da avaliação nos testes de sensibilidade. Vale ainda ressaltar que, esses gráficos representam também o crescimento bacteriano utilizando o inóculo de 100µL de 0,5 de absorbância em 660nm, inóculo idêntico ao que foi utilizado nos experimentos de sensibilidade. Pode-se observar que, com esse valor e volume de inóculo bacteriano, o crescimento ocorreu de forma uniforme, sem haver consumo total do meio de cultura no tempo de crescimento, o que é uma condição ideal para que sejam realizados os testes de sensibilidade às catecolaminas e ao cortisol.

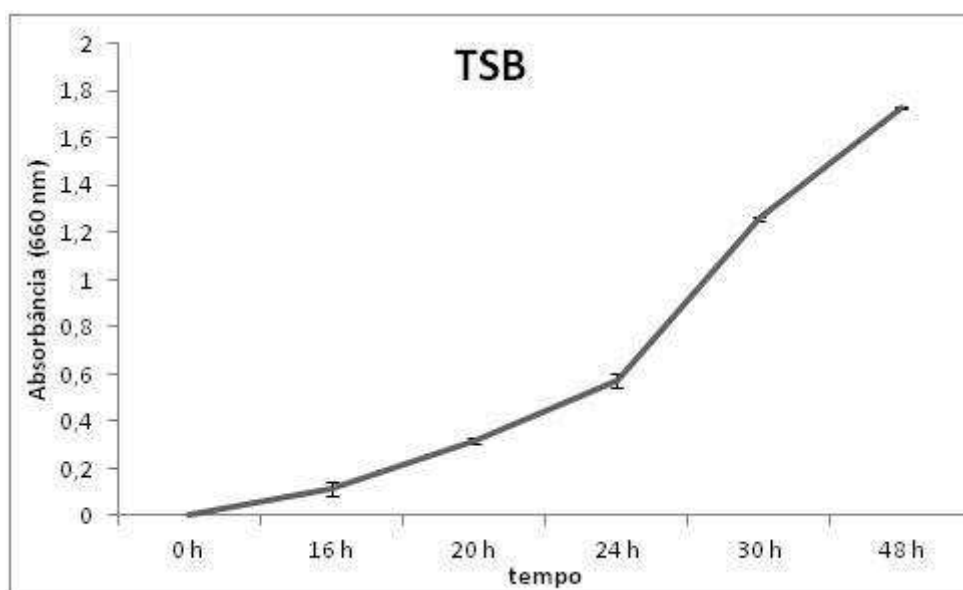


Figura 1: Crescimento de *P. gingivalis* durante 48 horas em meio TSB

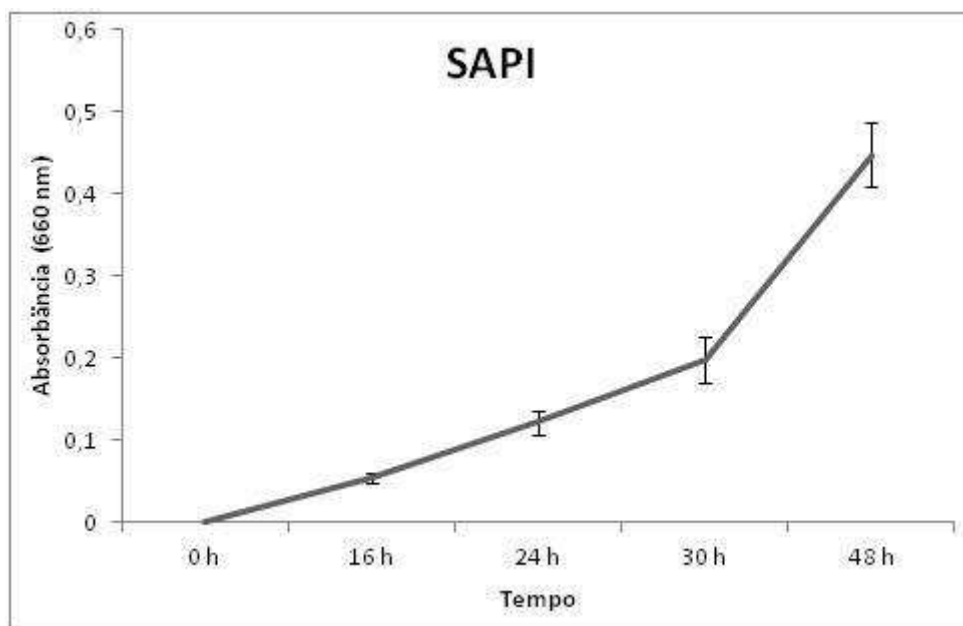


Figura 2: Crescimento de *P. gingivalis* durante 48 horas em meio SAPI

5.2 ENSAIOS DE SENSIBILIDADE DE *P. GINGIVALIS* W83 EXPOSTA ÀS SUBSTÂNCIAS TESTE NO TEMPO INICIAL DE CRESCIMENTO

Em relação ao teste de sensibilidade da bactéria *P. gingivalis* às substâncias relacionadas ao estresse, encontram-se abaixo as figuras que representam o crescimento dessa bactéria em meio SAPI sem hemina e menadiona (SAPI - figura 3), meio SAPI com hemina e menadiona (SAPI-HM – figura 4) e meio TSB com hemina e menadiona (TSB-HM – figura 5), após 24 e 48 horas de exposição à adrenalina, noradrenalina e cortisol. Em relação ao período de 24 horas, não houve nenhum efeito da adrenalina e noradrenalina sobre o crescimento de *P. gingivalis* ($p > 0,05$, ANOVA). Apesar de haver uma redução leve no crescimento bacteriano na presença do cortisol, em grande parte das condições testadas não houve diferença estatística ($p > 0,05$, ANOVA). Somente quando as culturas de *P. gingivalis* foram avaliadas no meio TSB-HM no tempo de 24 horas é que houve uma redução significativa no crescimento ($p < 0,05$, ANOVA, Dunnet); mas houve recuperação do crescimento no tempo de 48 horas, já que as culturas expostas ao cortisol apresentaram crescimento semelhante ao controle ($p > 0,05$, ANOVA). Também não foi observada nenhuma alteração no crescimento no período de 48 horas para os outros meios de cultura (SAPI e SAPI-HM) quando a bactéria foi exposta às catecolaminas ($p > 0,05$, ANOVA).

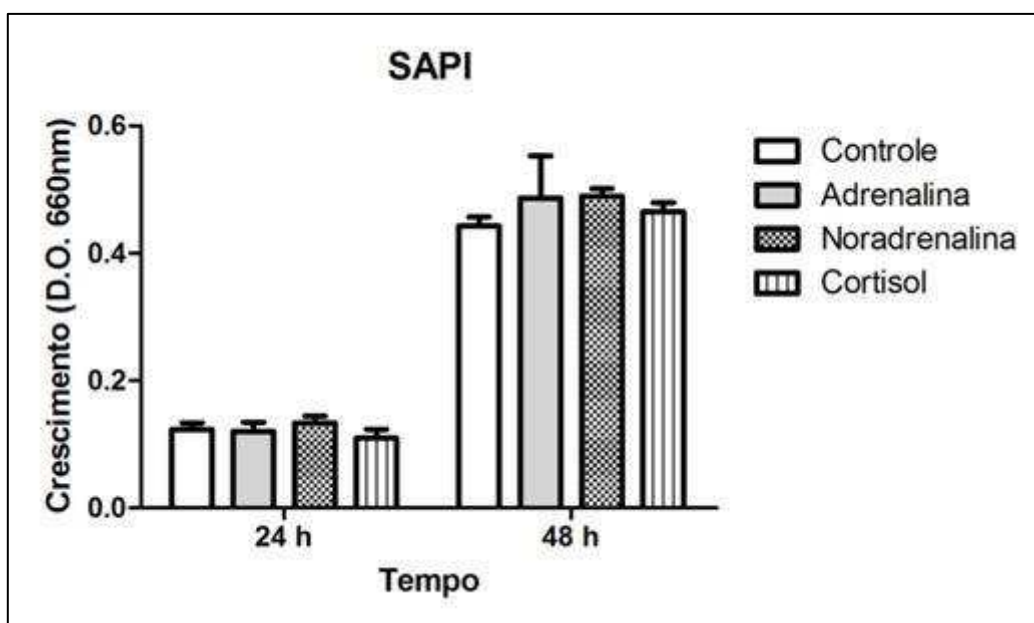


Figura 3 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660 nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio SAPI após 24 e 48 horas de exposição à adrenalina, noradrenalina e cortisol ($p>0,05$; ANOVA)

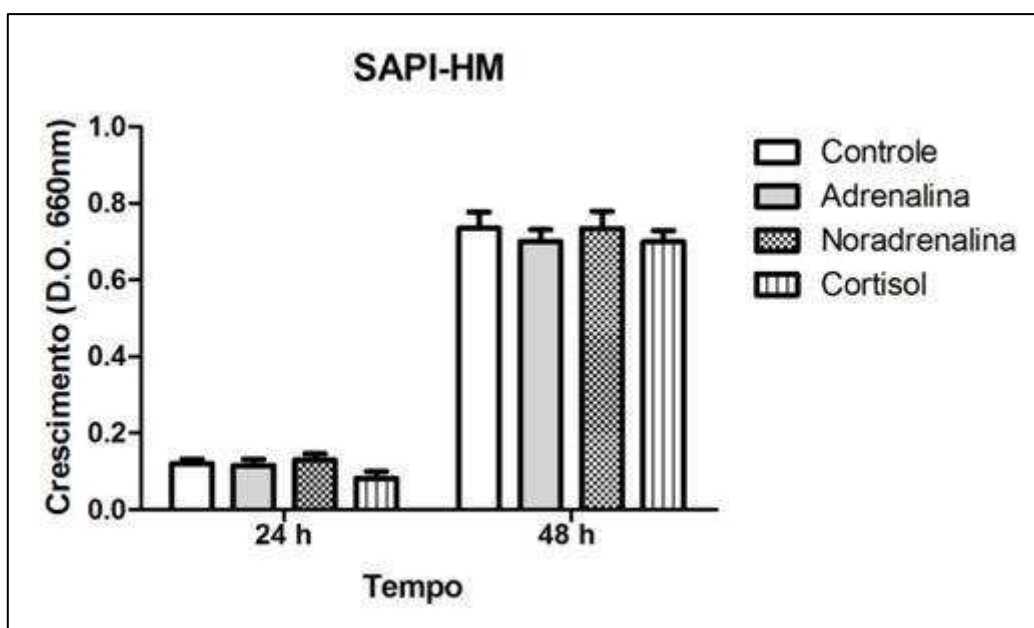


Figura 4 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660 nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio SAPI-HM após 24 e 48 horas de exposição à adrenalina, noradrenalina e cortisol ($p>0,05$; ANOVA)

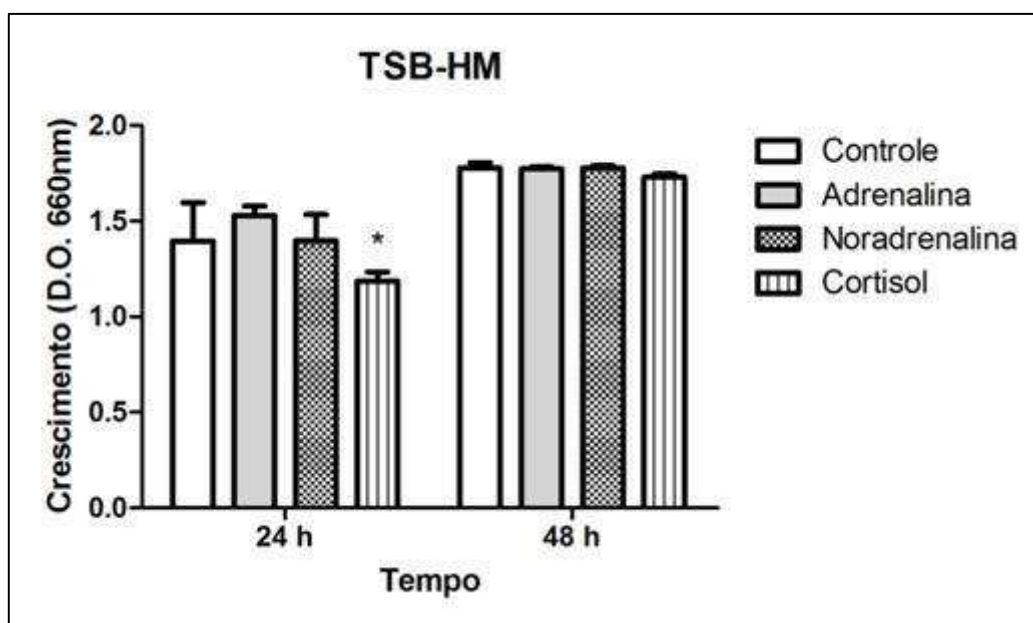


Figura 5 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorvância (660 nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio TSB-HM após 24 e 48 horas de exposição à adrenalina, noradrenalina e cortisol (O símbolo (*) representa diferença estatística em relação ao controle; $p < 0,05$; ANOVA, Dunnet)

5.3. ENSAIOS DE SENSIBILIDADE DE *P. GINGIVALIS* W83 EXPOSTA ÀS SUBSTÂNCIAS TESTE NA FASE LOGARÍTMICA DE CRESCIMENTO

A fim de conhecer os efeitos da adrenalina, da noradrenalina e do cortisol sobre a cultura de *P. gingivalis* com o seu início do crescimento já estabelecido e também de avaliar a curta exposição da bactéria a essas substâncias, culturas de *P. gingivalis* com 16 (meio de cultura TSB-HM) e 24 horas de crescimento (SAPI e SAPI-HM) foram expostas à adrenalina, noradrenalina e cortisol e avaliadas quanto à sua densidade óptica após 4 horas dessa exposição. A figura 6 representa o crescimento de *P. gingivalis* em meio SAPI e enquanto a figura 7 e 8 representam o desenvolvimento da

bactéria em meio SAPI-HM e TSB-HM, respectivamente. Em nenhuma das condições experimentais houve alteração do crescimento de *P. gingivalis* ($p > 0.05$, ANOVA).

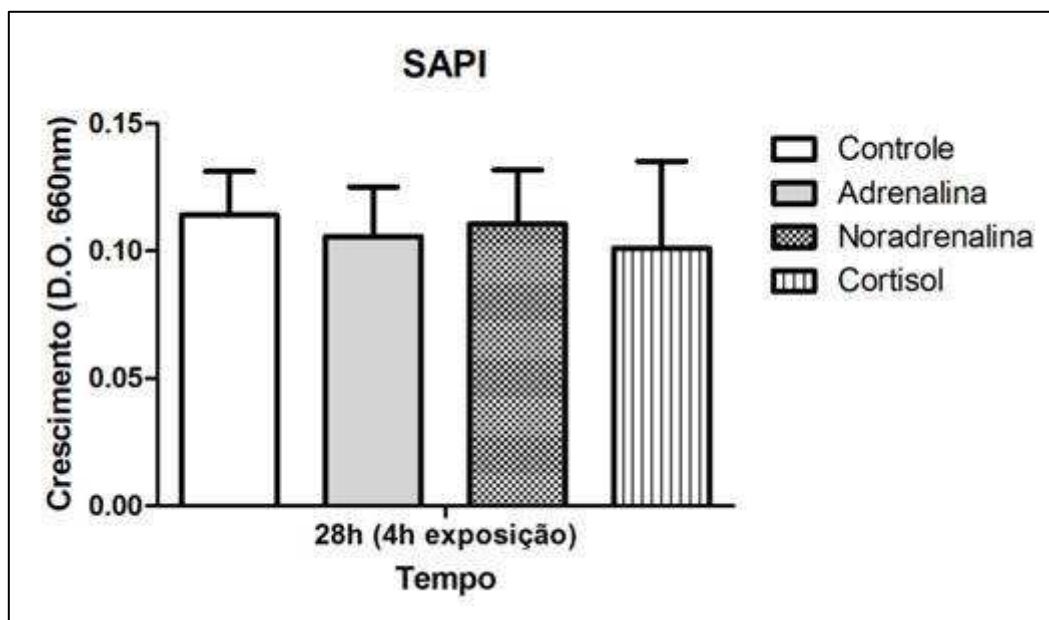


Figura 6 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660 nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio SAPI no tempo de 24 horas, após exposição de 4 horas à adrenalina, noradrenalina e cortisol (exposição iniciada no tempo 24 h de crescimento; $p > 0,05$; ANOVA)

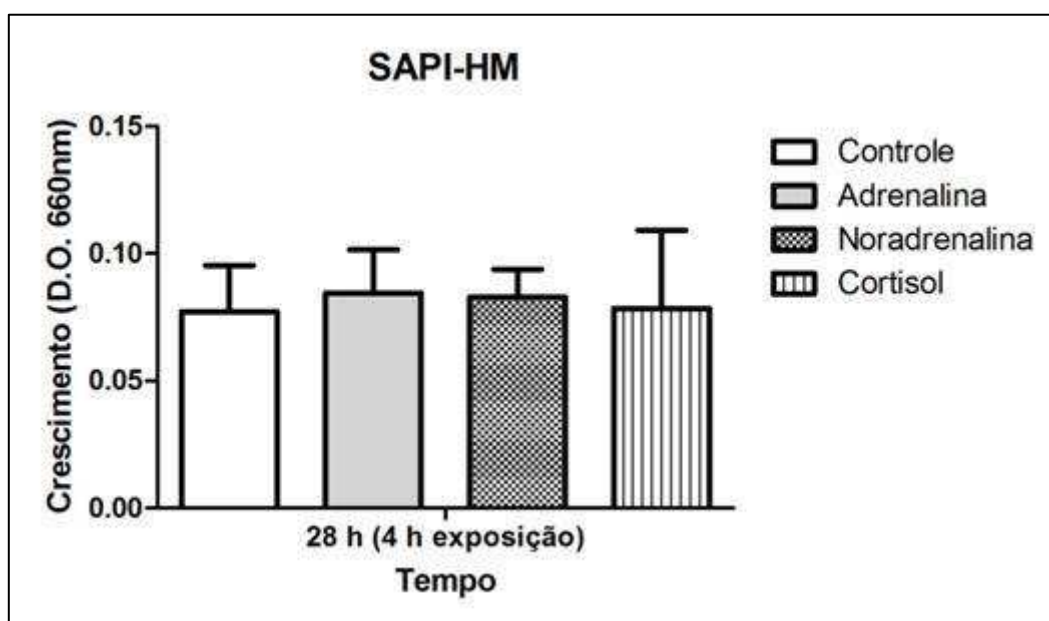


Figura 7 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorbância (660 nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio SAPI-HM com hemina e menadiona no tempo de 28 horas, após exposição de 4 horas à

adrenalina, noradrenalina e cortisol (exposição iniciada no tempo 24 h de crescimento, $p > 0,05$; ANOVA)

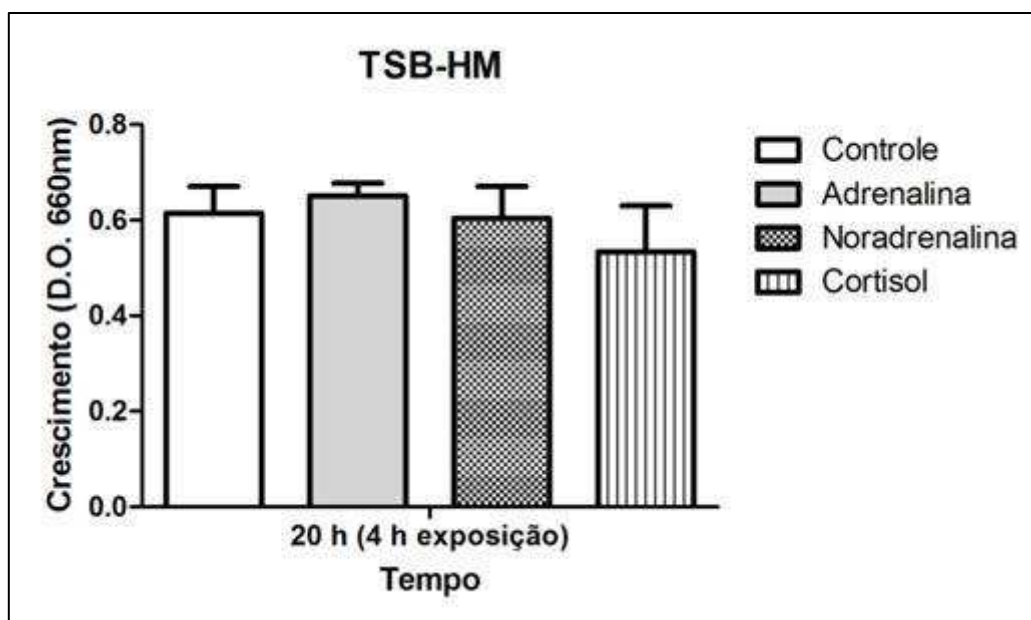


Figura 8 - Valores da média e desvio padrão das leituras de absorvância (660 nm) representando o crescimento de *P. gingivalis* em meio TSB-HM no tempo de 20 horas, após exposição de 4 horas à adrenalina, noradrenalina e cortisol (exposição iniciada no tempo 16 h de crescimento $p > 0,05$; ANOVA)

5.4 ENSAIO DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA AO METRONIDAZOL NA PRESENÇA DE ADRENALINA, NORADRENALINA E CORTISOL

Os testes de sensibilidade de *P. gingivalis* ao metronidazol foram realizados em culturas previamente expostas à adrenalina, noradrenalina e cortisol em dois diferentes meios de cultura: TSB-HM e SAPI-HM. Culturas de *P. gingivalis* de 16 horas (TSB-HM) e 24 horas (SAPI-HM) de crescimento foram expostas a 0,06mg/mL de metronidazol por um período de uma hora. A quantidade de micro-organismos (UFC/mL) foi quantificada antes e após a exposição ao antimicrobiano (T=0h – antes; T=1h – depois) e o resultado foi

mostrado em % de redução (UFC/mL em T=0 menos UFC/mL em T=1). O grupo denominado tratado é aquele que foi exposto a uma das substâncias teste enquanto o controle é o grupo que foi testado no mesmo experimento, mas que não foi exposto nem a catecolaminas e nem ao cortisol. Na tabela 1, estão descritos os valores de % de redução de micro-organismos viáveis após a incubação por uma hora com o metronidazol para cada um dos grupos tratados e seus respectivos controles. Nenhum dos grupos apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis), ou seja, a exposição das culturas bacterianas à adrenalina, noradrenalina e cortisol não alterou a sensibilidade de *P. gingivalis* ao antimicrobiano.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da porcentagem de redução de bactérias viáveis após a incubação com metronidazol por uma hora dos grupos adrenalina, noradrenalina, cortisol e seus respectivos controles não tratados

	Adrenalina		Noradrenalina		Cortisol	
	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle
SAPI-HM	23.55%	20.18%	45.25%	39.98%	34.00%	34.65%
	(±1.85)	(±3.77)	(±5.7)	(±10.12)	(±9.81)	(±11.03)
TSB-HM	19.10%	19.82%	25.63%	33.45%	40.74%	35.91%
	(±11.28)	(±14.95)	(±12.65)	(±15.13)	(±8,80)	(±10,44)

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para a avaliação da expressão gênica de *P. gingivalis* frente às catecolaminas e ao cortisol, culturas bacterianas crescidas em meio SAPI-HM, expostas ou não às substâncias relacionadas ao estresse foram testadas. Foram avaliados genes relacionados a aquisição bacteriana de ferro (*feOB-1*; *feOB-2*; *hmuY*; *hmuR*; *ftn*); estresse oxidativo (*tlr*; *tpx*; *oxyR*; *dps*; *rbr*; *sodB*; *ahpC*; *ahpF*); hemólise e proteólise (*hem*; *hagA*; *hagB*; *hagC*; *hagD*; *hagE*; *kgp*; *rgpA*; *rgpB*; *pepC*; *ptr*) e genes relacionados a produção de proteínas de superfície envolvidas na virulência (*fimA*; *ragA*; *ragB*). Como genes referências foram utilizados os genes 16SrRNA e PG 1357. Os dados são mostrados em valores de expressão relativa comparados ao grupo controle. O símbolo * representa os valores que apresentaram diferença estatística ($p < 0.05$ - método do Cq comparativo; valores de expressão gênica calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001). A análise estatística foi realizada utilizando o software REST (versão 2009), que utiliza para comparação o teste de realocação de pares por aleatorização fixa.

Os resultados da expressão gênica para os genes relacionados à virulência e ao estresse oxidativo estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Razão de expressão gênica em relação ao grupo controle para os grupos adrenalina, noradrenalina e cortisol. Valores referentes ao número de vezes que o gene foi expresso em relação ao grupo controle (controle - expressão igual a 1).

Gene	Definição	Categoria	Locus <i>tag</i>	Expressão em relação ao controle		
				Adrenalina	Noradrenalina	Cortisol
Aquisição de ferro e hemina						
<i>feoB-1</i>	<i>ferrous iron transport protein B</i>	Transporte e ligação de proteínas: cátions e compostos portadores de ferro	PG 1043	1.28	0.47	0.61
<i>feoB-2</i>	<i>ferrous iron transport protein B</i>	Transporte e ligação de proteínas: cátions e compostos portadores de ferro	PG1294	1.25	1.45	0.68
<i>hmuY</i>	<i>hmuY protein</i>	Transporte e ligação de proteínas: cátions e compostos portadores de ferro	PG1551	0.69	1.23	1.67
<i>hmuR</i>	<i>TonB-dependent receptor HmuR</i>	Transporte e ligação de proteínas: cátions e compostos portadores de ferro	PG1552	0.88	2.67*	1.41
<i>ftn</i>	<i>Ferritin</i>	Transporte e ligação de proteínas: cátions e compostos portadores de ferro	PG1286	1.15	1.32	0.63
<i>tlr</i>	<i>TonB-linked receptor Tlr, authentic frameshift</i>	Transporte e ligação de proteínas: cátions e compostos portadores de ferro	PG0644	1.68*	1.50*	1.56*

Gene	Definição	Categoria	Locus tag	Expressão em relação ao controle		
				Adrenalina	Noradrenalina	Cortisol
Estresse oxidativo						
Oxidative stress						
<i>tpx</i>	<i>thiol peroxidase</i>	Processos celulares: desintoxicação	PG1729	1.95*	1.08	1.48
<i>oxyR</i>	<i>redox-sensitive transcriptional activator OxyR</i>	Funções regulatórias: outras	PG0270	1.62	1.87*	1.70
<i>dps</i>	<i>Dps family protein</i>	Processos celulares: adaptações às condições atípicas	PG0090	2.66*	2.50*	0.86
<i>rbr</i>	<i>Rubrerythrin</i>	Metabolismo energético: transporte de elétrons	PG0195	1.58	1.66	0.73
<i>sodB</i>	<i>superoxide dismutase, Fe-Mn</i>	Processos celulares: desintoxicação	PG1545	1.96*	2.12*	2.22*
<i>aphC</i>	<i>alkyl hydroperoxide reductase, C subunit</i>	Processos celulares: desintoxicação	PG0618	3.14*	2.51*	1.34
<i>aphF</i>	<i>alkyl hydroperoxide reductase, F subunit</i>	Processos celulares: desintoxicação	PG0619	1.71	0.84	0.44
Proteólise e hemólise						
<i>hem</i>	<i>Hemolysin</i>	Processos celulares: Patogênese	PG1875	2.70*	2.03*	0.91
<i>hagA</i>	<i>hemagglutinin protein HagA</i>	Processos celulares: Patogênese	PG1837	1.72*	1.38	0.92
<i>hagB</i>	<i>hemagglutinin protein HagB</i>	Processos celulares: Patogênese	PG1972	1.61	1.05	0.93
<i>hagC</i>	<i>hemagglutinin protein HagC</i>	Processos celulares: Patogênese	PG1975	1.06	1.12	1.27

Gene	Definição	Categoria	Locus tag	Expressão em relação ao controle		
				Adrenalina	Noradrenalina	Cortisol
Proteólise e hemólise						
<i>hagD</i>	<i>hemagglutinin protein HagD</i>	Processos celulares: Patogênese	PG1844	1.29	1.02	0.99
<i>hagE</i>	<i>hemagglutinin protein HagE</i>	Processos celulares: Patogênese	PG2024	1.12	1.08	0.96
<i>kgp</i>	<i>Lys-gingipain (kgp) gene</i>	Processos celulares: Patogênese	PGN1728	1.44	1.38	0.56
<i>rgpA</i>	<i>arginine-specific cysteine proteinase RgpA</i>	Degradação de proteínas, peptídeos, e glicopeptídeos	PGN1970	1.03	1.22	0.89
<i>rgpB</i>	<i>arginine-specific cysteine proteinase RgpB</i>	Degradação de proteínas, peptídeos, e glicopeptídeos	PGN1466	1.24	1.14	1.39
<i>pepC</i>	<i>aminopeptidase C</i>	Degradação de proteínas, peptídeos, e glicopeptídeos	PG1605	0.99	1.21	1.06
<i>ptr</i>	<i>thiol protease</i>	Degradação de proteínas, peptídeos, e glicopeptídeos	PG1055	0.99	0.59	0.83

Gene	Definição	Categoria	Locus tag	Expressão em relação ao controle		
				Adrenalina	Noradrenalina	Cortisol
Envelope celular						
<i>fimA</i>	<i>Fimbrilin</i>	Envelope celular: estruturas de superfície	PG2132	1.15	1.41	1.56
<i>ragA</i>	<i>ragA protein</i>	Função desconhecida: geral	PG0185	2.13*	1.08	1.09
<i>ragB</i>	<i>lipoprotein RagB</i>	Função desconhecida: outra	PG0186	1.30	1.36	1.25

- Diferenças significativas entre o grupo tratamento e o grupo controle foram consideradas quando $*p < 0.05$ (análise estatística – teste de modo pareado fixo de realocação ao acaso - *Pair wise reallocation randomisation test*[®] (Pfaffl, 2002).
- Os valores de expressão gênica foram calculados segundo o método do Cq comparativo (Pfaffl, 2001, 2002)
- *Locus tags* foram consultadas nas seguintes bases: JCVI - J. Craig Venter Institute (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>) e Nucleotide Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AE015924.1>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AP009380.1>)

6 DISCUSSÃO

A relação entre estresse e o desenvolvimento de doenças infecciosas, dentre elas a periodontite, vem sendo alvo de alguns estudos nas últimas décadas (Cohen & Williamson, 1991; Ng et al., 2006; Dowd, 2007; Ishisaka et al., 2007; Peruzzo et al., 2008; Akcali et al., 2013), mas apesar de diversos estudos indicarem que as catecolaminas e o cortisol influenciam o crescimento, virulência e o metabolismo dos micro-organismos (Bansal et al., 2007; Cogan et al., 2007; Lyte & Ernest, 1992; Lyte, 1993; Karavolos et al., 2008; O'Donnell et al., 2006), incluindo *P. gingivalis* (Roberts et al., 2002; Belay et al., 2003; Saito et al., 2011; Jentsch et al., 2013; Akcali et al., 2013a, 2013b), a relação das catecolaminas e do cortisol com os micro-organismos orais ainda precisa ser elucidada. O presente estudo demonstrou que as substâncias relacionadas ao estresse, apesar de não interferirem no crescimento, viabilidade e susceptibilidade antimicrobiana, são capazes de alterar a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e virulência de *Porphyromonas gingivalis*.

No presente estudo, o micro-organismo *P. gingivalis* não sofreu alteração significativa do crescimento quando exposto às catecolaminas. Em estudo conduzido por Roberts et al. (2002), culturas de *P. gingivalis* em meio SAPI enriquecido com hemina, menadiona e glicose, apresentaram uma leve redução no crescimento quando exposta à adrenalina e à noradrenalina, ou seja, um comportamento contrário ao apresentado no presente estudo. Entretanto, nesse estudo foi utilizada uma cepa diferente do micro-organismo em questão, enquanto

utilizou a cepa ATCC 33277, nosso estudo utilizou a cepa W83, o que pode explicar essa diferença encontrada.

Belay et al. (2003) encontraram um baixo crescimento quando expôs *P. gingivalis* às catecolaminas em meio SAPI; no entanto os resultados revelaram que as catecolaminas não alteraram o crescimento de *P. gingivalis*. Jentsch et al. (2013), também verificaram que as catecolaminas não alteram o perfil de crescimento de *P. gingivalis*, utilizando concentrações em escalas nanomolares. Esses resultados se assemelham aos encontrados ao nosso estudo, mesmo sendo em cepas diferentes de *P. gingivalis*. Em contrapartida, Saito et al. (2011) verificaram que *P. gingivalis* apresentou uma redução de até 40% em seu crescimento quando exposta à noradrenalina, ou seja, uma redução bastante expressiva. Entretanto, Saito et al (2011) em seu estudo foi utilizada a cepa FDC381. Além disso, o inóculo utilizado pelo autor difere bastante em relação a esse e aos outros estudos; para o inóculo foram utilizadas culturas com 24 horas de crescimento e a partir delas foi feita uma diluição de 1:40, desse modo, não se conhece a quantidade inicial de células bacterianas utilizadas pelo autor, o que dificulta possíveis comparações.

Na presença do cortisol, o presente estudo demonstrou um perfil geral de leve redução no crescimento quando *P. gingivalis* foi exposta a essa; no entanto somente nas culturas crescidas durante 24 horas em meio TSB-HM essa diferença foi estatisticamente significativa. Ainda, nesse mesmo meio de cultura, no tempo de 48 horas, a bactéria apresentou recuperação dos níveis de crescimento, se assemelhando ao controle. Em um estudo conduzido por Akcali et al. (2013b), culturas de *P. gingivalis* ATCC 33277 em meio BHI suplementadas com hemina e menadiona foram expostas ao cortisol, em concentrações que variaram entre 0,014

e 55 μ M. O crescimento bacteriano aumentou significativamente nas primeiras 24 horas, onde o maior estímulo ocorreu no tempo de 12 horas. Esses resultados também diferem dos encontrados no presente estudo em relação ao cortisol; enquanto nosso estudo não encontrou diferença no crescimento, o estudo de Akcali et al. (2013b) resultou no aumento significativo do crescimento da bactéria. Essa diferença talvez se deva à cepa utilizada e às concentrações de cortisol. Já o estudo de Jentsch et al. (2013), que utilizaram concentrações superiores as utilizadas no presente estudo (entre 137 – 685 μ M), não observaram alterações no crescimento de *P. gingivalis* ATCC 33277.

Analisando os resultados acima, pode-se observar que ainda há grande divergência em relação aos efeitos das catecolaminas e cortisol sobre o crescimento de *P. gingivalis*. Muito dessas diferenças podem ter ocorrido pelas diferenças nas condições experimentais de cada estudo. Já foi demonstrado que, as catecolaminas testadas em diferentes condições experimentais, como em diferentes concentrações do inóculo bacteriano e diferentes tipos de meio de cultura podem apresentar diferentes efeitos, como a estimulação ou não estimulação do crescimento bacteriano (O'Donnell et al., 2006). Dessa forma, pode-se atribuir em parte, que a diferença entre os resultados encontrados entre os estudos pode estar relacionada a esses fatores experimentais.

O estresse pode aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções (Peterson et al., 1991; Karavolos et al., 2013), no entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram esclarecidos. Sendo assim, o presente estudo considerou a hipótese de que as catecolaminas e o cortisol poderiam reduzir a sensibilidade de *P. gingivalis* aos antimicrobianos, entre eles, o metronidazol. No

entanto, em relação aos ensaios de sensibilidade *P. gingivalis* ao metronidazol na presença das catecolaminas e do corticosteróide, não foram encontradas diferenças significativas. O único estudo que testou a mesma hipótese de que as catecolaminas poderiam alterar a sensibilidade aos antimicrobianos, observou que *Salmonella enteric serovar Typhimurium* apresentou maior sensibilidade à polimixina B após exposição à adrenalina (Karavolos et al., 2008). Sendo assim, dentro das limitações do presente estudo e das escassas informações presentes na literatura, pode-se concluir que as catecolaminas e o cortisol parecem não reduzir a sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos. Estudos com outros antimicrobianos devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Ao se analisar o efeito das catecolaminas e do corticosteroide sobre os principais genes relacionados à aquisição de ferro, virulência e estresse oxidativo do micro-organismo *P. gingivalis* no presente estudo, verificou-se que essas substâncias, em especial as catecolaminas, podem alterar a expressão gênica desse micro-organismo. O estudo de Saito et al. (2011) foi o único estudo encontrado na literatura em que se avaliou o efeito das catecolaminas sobre a expressão gênica de *P. gingivalis*; na presença da noradrenalina dois genes apresentaram redução em sua expressão, enquanto que 18 genes, associados ao estresse oxidativo e ao metabolismo, aumentaram sua expressão, com destaque para a expressão do *rgpB* que foi duas vezes maior. Desse modo, os resultados do presente estudo corroboram com os encontrados por Saito et al. (2011), demonstrando que as catecolaminas exercem alterações significativas na expressão gênica de *P. gingivalis*, principalmente em relação aos genes associados a virulência. Em relação ao cortisol, não foram encontrados estudos na literatura em

que avaliassem seu efeito sobre a expressão gênica do micro-organismo em questão.

Apesar de estudar outra espécie bacteriana, Li et al. (2012) investigaram se *A. pleuropneumoniae* teriam sua expressão gênica alterada em presença das catecolaminas, comparando perfis de expressão gênica, incluindo genes de virulência, após tratamento com adrenalina e noradrenalina com os de bactérias não tratadas. Os resultados revelaram que a expressão gênica foi alterada em resposta a ambas as catecolaminas.

No presente estudo, além do gene *oxyR* ter sido alterado de forma significativa, outros genes (*tpx*, *dps*, *sodB*, *aphC*) relacionados à resposta ao estresse oxidativo na presença da adrenalina e/ou noradrenalina aumentaram a sua expressão. O cortisol promoveu o aumento nos níveis de RNAm somente do gene *sodB*. Assim, pode-se inferir que as catecolaminas e o corticosteroide talvez possam exercer o papel de contribuir para a sobrevivência de *P. gingivalis* frente às situações de estresse oxidativo, como à exposição esporádica ao oxigênio bem como aos radicais livres liberados pelos leucócitos.

Como pode ser observado, tanto no presente estudo como no estudo de Saito et al. (2011), os genes que foram alterados na presença do cortisol e das catecolaminas estão envolvidos na virulência e no estresse oxidativo de *P. gingivalis*. O estresse oxidativo é resultado de uma série de produtos tóxicos produzidos a partir do O_2 , como o radical livre superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH). Desse modo, a metabolização do O_2 sem gerar produtos tóxicos ou a modificação/remoção dos agentes tóxicos é fundamental para a sobrevivência dos micro-organismos diante do estresse oxidativo (Bowden e

Hamilton, 1988). No caso dos micro-organismos associados à doença periodontal a proteção contra o estresse oxidativo permite a sobrevivência dentro das bolsas periodontais quando as mesmas são expostas a condições aeróbicas (Ueshima et al., 2003).

Seis genes envolvidos na aquisição de ferro e heme foram avaliados no presente trabalho (*feob-1*, *feob-2*, *hmuY*, *hmuR*, *ftn* and *tlr*). Apenas o gene *humR* foi estimulado pela noradrenalina. As catecolaminas já foram apontadas como substâncias capazes de formar complexos com a transferrina e lactoferrina, pela interação direta dessas substâncias com o ferro complexado nessas proteínas, resultando em redução do Fe(III) em Fe(II) (Sandrini et al., 2010). No presente estudo, a transferrina e a lactoferrina não foram utilizadas para o crescimento bacteriano; a hemina foi a fonte de ferro adicional fornecida para *P. gingivalis*. O aumento da expressão do gene *humR* sugere que mais hemina possa ser utilizada pela bactéria quando exposta à adrenalina. No entanto, essa hipótese precisa ser confirmada, desde que nenhum trabalho anterior apresenta mecanismos pelos quais as catecolaminas possam interagir com o ferro contido na hemina.

Genes relacionados diretamente com a virulência também foram alterados com o tratamento com as catecolaminas. A adrenalina estimulou a expressão dos genes de hemolisina (*hem*), hemaglutina (*hagA*) e a proteína de superfície imunodominante *ragA*, enquanto a noradrenalina elevou os níveis de RNAm do gene *hem*. Já o cortisol não alterou a expressão de nenhum dos genes de virulência. As hemaglutininas e a hemolisina são consideradas importantes fatores de virulência por facilitarem a aquisição de heme, que é essencial para o crescimento bacteriano, a partir de eritrócitos e outras células do hospedeiro (Lepine

et al., 1996; Belanger et al., 2012). As hemaglutininas HagA e HagB são capazes de mediar a adesão de *P. gingivalis* às células endoteliais e células epiteliais da gengiva (Song et al., 2005). As proteínas RagA e RagB, que são proteínas de superfície imuno-dominantes já foram encontradas no soro de pacientes com periodontite (Curtis et al., 1991). Inclusive, já foi demonstrado que a proteína RagA é estimulada na presença de nicotina e cotinina (Cogo et al., 2012). Essa é uma proteína homóloga dos receptores Ton-B e participa na aquisição de ferro pela *P. gingivalis* (Chen & Duncan, 2004). Saito et al. (2011), detectaram um aumento da expressão de genes relacionados à virulência, como o gene *rgpB*, que é responsável pela produção das gingipaínas e está envolvida na patogênese das periodontites (Bostanci & Belibasakis, 2012). Apesar do presente estudo não encontrar diferenças nos níveis de expressão de *rgpB*, nossos achados reforçam a hipótese de que a adrenalina e a noradrenalina podem elevar a expressão de genes de virulência de *P. gingivalis*.

Como demonstrado por diversos autores, as catecolaminas e o cortisol não desencadeiam a mesma resposta em todos os micro-organismos, enquanto alguns não são afetados, outros podem ser estimulados ou inibidos (Belay et al., 2003; Roberts et al., 2002, 2005; O'Donnell et al., 2006; Jentsch et al., 2013; Akcali et al., 2013b). O presente estudo observou que nem as catecolaminas e nem o cortisol alteram de forma significativa o crescimento de *P. gingivalis* in vitro. No entanto, um aumento significativo da expressão de genes relacionados à proteção contra o estresse oxidativo e alguns genes relacionados à virulência foram observados. Talvez, essas alterações na expressão gênica possam contribuir para tornar a bactéria mais virulenta, ou seja, mais agressiva e mais resistente aos efeitos

deletérios dos radicais livres de oxigênio; fatores que poderiam contribuir para o desenvolvimento e agravamento das periodontites. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar a relação entre a adrenalina, noradrenalina, cortisol e a *P. gingivalis*, principalmente para entender os mecanismos de ação envolvidos nessa relação e avaliar a relevância clínica desses fenômenos.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que a adrenalina, noradrenalina e o cortisol, foram capazes de alterar a expressão de genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo, à aquisição de ferro e à virulência de *P. gingivalis*, mesmo sem alterar o crescimento de forma expressiva. Esses resultados sugerem que a virulência de *P. gingivalis* pode ser afetada por uma possível interação dessa bactéria com os hormônios relacionados à resposta do estresse.

REFERÊNCIAS¹

1. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *Journal of periodontology* 1965;36:177-87.
2. Van Dyke TE, Van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *Journal of clinical periodontology* 2013;40Suppl14:S1-7.
3. Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2004;72:3743-51.
4. Imamura T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2003;74:111-8.
5. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS microbiology letters* 2012;333:1-9.
6. Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH, Nogueira-Filho GR. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol* 2008;79(4):697-704.
7. Vettore MV, Leão AT, Monteiro da Silva AM, Quintanilha RS, Lamarca GA. The relationship of stress and anxiety with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2003;30(5):394-402.
8. Vettore M, Quintanilha RS, Monteiro da Silva AM, Lamarca GA, Leão AT. The influence of stress and anxiety on the response of non-surgical periodontal treatment. *J Clin Periodontol* 2005;(12):1226-35.
9. Ng SK, Leung WK. A community study on the relationship between stress, coping, affective dispositions and periodontal attachment loss. *Community Dent Oral Epidemiol* 2006;34(4):252-66.
10. Ishisaka A, Ansai T, Soh I, Inenaga K, Yoshida A, Shigeyama C, Awano S, Hamasaki T, Sonoki K, Takata Y, Takehara T. Association of salivary levels of cortisol and dehydroepiandrosterone with periodontitis in older Japanese adults. *J Periodontol* 2007;78(9):1767-73.
11. Ishisaka A, Ansai T, Soh I, Inenaga K, Awano S, Yoshida A. Association of cortisol and dehydroepiandrosterone sulphate levels in serum with periodontal status in older Japanese adults. *J Clin Periodontol* 2008;35(10):853-61.
12. Akcali A, Huck O, Tenenbaum H, Davideau JL, Buduneli N. Periodontal diseases and stress: a brief review. *Journal of oral rehabilitation* 2013a;40:60-8.

¹Referências elaboradas de acordo com modelo Vancouver

13. Cryer PE. Physiology and pathophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. *N Engl J Med* 1980;303(8):436-44.
14. Lyte M. The role of microbial endocrinology in infectious disease. *J Endocrinol*. 1993;137(3):343-5.
15. Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, Kawano M, Harada N, Mawatari K, Nakaya Y. Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species. *Lett Appl Microbiol*. 2007;44(6):649-53.
16. Karavolos MH, Spencer H, Bulmer DM, Thompson A, Winzer K, Williams P, Hinton JC, Khan CM. Adrenaline modulates the global transcriptional profile of *Salmonella* revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses. *BMC Genomics* 2008;9:458.
17. Freestone PPE, Sandrini SM, Haigh RD, Lyte M. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends in Microbiology* 2008;16(2):55-64.
18. Black PH. Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and immune system consequences. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(1):1-6.
19. Taylor GR, Konstantinova IR, Sonnenfeld G, Jennings R. Changes in the immune system during and after spaceflight. *Adv Space Biol Med* 1997;6:1-2.
20. Sonnenfeld G. Immune responses in space flight. *Intl J Sports Med* 1998;19:S195-S204.
21. Lyte M, Ernst S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sci* 1992;50(3):203-12.
22. O'Donnell PM, Aviles H, Lyte M, Sonnenfeld G. Enhancement of in vitro growth of pathogenic bacteria by norepinephrine: importance of inoculum density and role of transferrin. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(7):5097-9.
23. Cogan TA, Thomas AO, Rees LE, Taylor AH, Jepson MA, Williams PH, Ketley J, Humphrey TJ. Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut* 2007;56(8):1060-5.
24. Dowd SE. *Escherichia coli* O157:H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. *FEMS Microbiol Lett* 2007;273(2):214-23.
25. Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PP, Williams PH, Chapple IL. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(5):296-303.
26. Belay T, Aviles H, Vance M, Fountain K, Sonnenfeld G. Catecholamines and in vitro growth of pathogenic bacteria: enhancement of growth varies greatly among bacterial species. *Life Sci* 2003;73(12):1527-35.

27. Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PP, Williams PH, Chapple IL. Stress and the periodontal diseases: growth responses of periodontal bacteria to *Escherichia coli* stress-associated autoinducer and exogenous Fe. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(3):147-53.
28. Saito T, Inagaki S, Sakurai K, Okuda K, Ishihara K. Exposure of *P. gingivalis* to noradrenaline reduces bacterial growth and elevates ArgX protease activity. *Arch Oral Biol* 2011;56(3):244-5.
29. Brown LJ, Oliver RC, Loe H. Doenças periodontais nos EUA em 1981: prevalência, gravidade, extensão, e seu papel na mortalidade dental. *J Periodontol* 1989;60:363-70.
30. Lindhe J. Tratado de periodontia e implantologia oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
31. American Academy of Periodontology. International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:53-4.
32. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(4):1244-63.
33. Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol*. 2004;75(8):1077-83.
34. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS microbiology letters* 2012;333:1-9.
35. Beck JD, Koch GG, Zambon JJ, Genco RJ, Tudor GE. Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *J Periodontol* 1992;63(2):93-9.
36. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol* 1998;36(11):3239-42.
37. Yano-Higuchi K, Takamatsu N, He T, Umeda M, Ishikawa I. Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27(8):597-602.
38. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, Van Der Reijden WA, Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology* 2002;29(11):1023-8.
39. Querido SM, Aquino DR, Cortelli SC, Cortelli JR. Avaliação clínica e microbiana da terapia periodontal mecânica em indivíduos com periodontite crônica. *Cienc Odontol Bras* 2004;7(1):43-51.

40. Wara-aswapati N, Pitiphat W, Chanchaimongkon L, Taweechaisupapong S, Boch JA, Ishikawa I. Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population. *Oral Dis* 2009;15(5):354-9.
41. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(4):1244-63.
42. Lamont RJ, Hersey SG, Rosan B. Characterization of the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 1992;47(4):193-7.
43. Goulbourne PA, Ellen RP. Evidence that *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J. Bacteriol* 1991;173(17):5266-74.
44. Kinder SA, Holt SC. Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. *Infect Immun* 1989;57(11):3425-33.
45. Grenier D. Demonstration of a bimodal coaggregation reaction between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7(5):280-4.
46. Yao ES, Lamont RJ, Leu SP, Weinberg A. Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11(1):35-41.
47. Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol* 2003;185(18):5591-601.
48. Guentsch A, Puklo M, Preshaw PM, Glockmann E, Pfister W, Potempa J, Eick S. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res* 2009;44(3):368-77.
49. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Fatores de virulência de *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000* 1999;20:168-238.
50. Noiri Y, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T, Ebisu S. Um estudo imuno-histoquímico sobre a localização de *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* e *Actinomyces viscosus* em humanos bolsas periodontais. *J Periodontol* 1997;Res32:598-607.
51. Sandros J, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium in vitro. *J Periodontol* 1994;Res.29:62-9.
52. Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracelular *Actinobacillus actinoquímica-mycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em células epiteliais bucais coletados de seres humanos. *Infect Immun* 2001;69:2700-7.

53. Amornchat C, Rassameemasmaung S, Sripairojthikoon W, Swasdison S. Invasão de *Porphyromonas gingivalis* em fibroblastos gengivais humanos in vitro. J Int Acad Periodontol 2003;(5):98-105.
54. Quirynen M, W. Papaioannou, van Steenberg T, Dierickx K, Cassiman JJ, van Steenberg D. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* strains to cultured epithelial cells from patients with a history of chronic adult periodontitis or from patients less susceptible to periodontitis. J Periodontol 2001;72:626-33.
55. Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Brammar GC, Slakeski N, Reynolds EC. Kgp and RgpB, but not RgpA, are important for *Porphyromonas gingivalis* virulence in the murine periodontitis model. Infect Immun 2007;75(3):1436-42.
56. Xia Q, Wang T, Taub F, Park Y, Capestany CA, Lamont RJ, Hackett M. Quantitative proteomics of intracellular *Porphyromonas gingivalis*. Proteomics 2007;7(23):4323-37.
57. Eick S, Reissmann A, Rödel J, Schmidt KH, Pfister W. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. Oral Microbiol Immunol 2006;21(4):231-7.
58. Okuda K. Attachment mechanisms and colonization. In: Shah HN, Mayrand D, Genco RJ (editors). Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc.; 1993.
59. Sheets SM, Potempa J, Travis J, Casiano CA, Fletcher HM. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce cell adhesion molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. Infect Immun 2005;73:1543-52.
60. Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 2000;187(2):139-44.
61. Lamont RJ, Yilmaz O. In or out: the invasiveness of oral bacteria. Periodontol 2000 2001;30:61-9.
62. Papapanou PN, J Sandros, K Lindberg, Duncun MJ, Niederman R, Nannmark U. *Porphyromonas gingivalis* may multiply and advance within stratified human junctional epithelium in vitro. J Periodontal 1994;Res.29:374-5.
63. Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 2004;72:3743-51.
64. Fitzpatrick R, Wijeyewickrema L, Pike R. The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Future Microbiology 2009;4(4):471-8.
65. Potempa J, Pavloff N, Travis J. *Porphyromonas gingivalis*: a proteínase/gene accounting audit. Trends Microbiol 1995;3(11):430-4.

66. Imamura T. The role of *gingipains* in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2003;74(1):111-8.
67. Chen T, Duncan MJ. Gingipain adhesin domains mediate *Porphyromonas gingivalis* adherence to epithelial cells. *Microb Pathog* 2004;36(4):205-9.
68. Potempa J, Bandula A, Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontology* 2000 2000;24:153-92.
69. Guo Y, Nguyen KA, Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol* 2000 2010;54(1):15-44.
70. Grenier D, La VD. Proteases of *Porphyromonas gingivalis* as important virulence factors in periodontal disease and potential targets for plant-derived compounds: a review article. *Curr Drug Targets* 2011;12(3):322-31.
71. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. 14. II. The effectiveness of clinical parameters in developing an accurate prognosis. *J Periodontol* 1996;67(7):658-65.
72. Papapanou NP, Lindhe J. Epidemiologia da doença periodontal. In: Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 43-65.
73. Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, Socransky SS, Beck JD. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol* 1998;3(1):233-50.
74. Mercado FB, Marshall RI, Bartold PM. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol* 2003;30(9):761-72.
75. Pischon N, Pischon T, Kröger J, Gülmez E, Kleber BM, Bernimoulin JP, Landau H, Brinkmann PG, Schlattmann P, Zernicke J, Buttgerit F, Detert J. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol* 2008;79(6):979-86.
76. Scannapieco FA, Genco RJ. Association of periodontal infections with atherosclerotic and pulmonary diseases. *J Periodontal Res* 1999;34(7):340-5.
77. Saito T, Yamaguchi N, Shimazaki Y, Hayashida H, Yonemoto K, Doi Y, Kiyohara Y, Iida M, Yamashita Y. Serum levels of resistin and adiponectin in women with periodontitis: the Hisayama study. *J Dent Res* 2008;87(4):319-22.
78. Sarlatti F, Akhondi N, Ettehad T, Neyestani T, Kamali Z. Relationship between obesity and periodontal status in a sample of young Iranian adults. *Int Dent J* 2008;58:36-40.

79. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 1999;70(7):711-23.
80. Johannsen A, Rylander G, Söder B, AsbergM. Dental plaque, gingival inflammation, and elevated levels of interleukin6 and cortisol in gingival crevicular fluid from women with stress-related depression and exhaustion. *J Periodontol* 2006 Aug;77(8):1403-9.
81. Linden GJ, Herzberg MC and on behalf of working group 4 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* 2013;40(suppl.14):S20–3.
82. Van Dyke TE, Van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol* 2013;40(suppl.14):S1–7.
83. Tonetti MS, VanDyke TE and on behalf of working group 1 of the joint EFP/AAP workshop and. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol* 2013;40(suppl.14):S24–9.
84. Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GMB, Nogueira-Filho GR, Sallun EA, Casati MZ, Nociti Jr FH. A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. *J Periodontol* 2007;78:1491-504.
85. Semenoff TADV, Rosa Júnior A, Álvaro HB, Porto AN, Cervantes C, Semenoff SA. Efeito do estresse crônico em ratos recém-nascidos sobre a progressão da ligadura periodontite induzida na idade adulta. *Acta Cir Bras* 2013 Set;28(9):652-6.
86. Cohen S, Williamson GM. Stress and infectious disease in humans. *Psychol Bull* 1991;109(1):5-24.
87. Hironaka M, Ansai T, Soh I, Ishisaka A, Awano S, Yoshida A, Hamasaki T, Sonoki K, Takata Y, Takehara T. Association between salivary levels of chromogranin A and periodontitis in older Japanese. *Biomed Res* 2008;29(3):125-30.
88. Yang EV, Glaser R. Stress-induced immunomodulation and the implications for health. *Int Immunopharmacol* 2002;2:315-24.
89. Googman, Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10^a ed. São Paulo: McGraw Hill; 2005.
90. Marques A, Sternberg E. Psiconeuroimunologia – A relação entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico. *Rev Bras Psiquiatr* 2004;26(3):143-4.
91. Lyte M. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends Microbiol* 2004;12:14-20.

92. Benedict CR, Grahame-Smith DG. Plasma noradrenaline and adrenaline concentrations and dopamine-beta-hydroxylase activity in patients with shock due to septicaemia, trauma and haemorrhage. *Q J Med* 1978;47(185):1-20.
93. Everest P. Stress e bactérias: microbiana endocrinologia. *Gut* 2007;56:1037-8.
94. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR, PA Ward. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007;449(7163):721-5.
95. Anderson MT, Armstrong SK. Norepinephrine mediates acquisition of transferrin-iron in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 2008;190(11):3940-7.
96. Freestone PPE, Lyte M, Neal CP, Maggs AF, Haigh RD, Willeams PH. The Mammalian Neuroendocrine Hormone Norepinephrine Supplies Iron for Bacterial Growth in the Presence of Transferrin or Lactoferrin. *Journal of Bacteriology* 2000;182(21):6091-8.
97. Burton CL, Chhabra SR, Swift S, Baldwin TJ, Withers H, Hill SJ, Williams P. The Growth Response of *Escherichia coli* to Neurotransmitters and Related Catecholamine Drugs Requires a Functional Enterobactin Biosynthesis and Uptake System. *Infect Immun* November 2002;70:11:5913-23.
98. Jones SB, Westfall MV, Sayeed MM. Plasma catecholamines during *E. coli* bacteremia in conscious rats. *Am J Physiol* 1988;254(3 Pt 2):R470-7.
99. Lyte M, Bailey MT. Neuroendocrine-bacterial interactions in a neutrotoxin-induced model of trauma. *J Surgical Research* 1997;70:195-201.
100. Cogan TA, Thomas AO, Rees LE, Taylor AH, Jepson MA, Williams PH, Ketley J, Humphrey TJ. Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni*. *Gut* 2007;56(8):1060-5.
101. Bansal T, Englert D, Lee J, Hegde M, Wood TK, Jayaraman A. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect Immun* 2007;75(9):4597-607.
102. Hilgert JB, Hugo FN, Bandeira DR, Bozzetti MC. Stress, cortisol, and periodontitis in a population aged 50 years and over. *J Dent Res* 2006Apr;85(4):324-8.
103. Roper JM, Raux E, Brindley AA, Schubert HL, Gharbia SE, Shah HN, Warren MJ. The enigma of cobalamin (Vitamin B12) biosynthesis in *Porphyromonas gingivalis*. Identification and characterization of a functional corrin pathway. *J Biol Chem* 2000;275(51):40316-23.
104. Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA. Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol* 2003;185(18):5591-601.

105. Olczak T, Simpson W, Liu X, Genco CA. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Rev 2005;29(1):119-44.
106. Hojo K, Nagaoka S, Murata S, Taketomo N, Ohshima T, Maeda N. Reduction of vitamin K concentration by salivary Bifidobacterium strains and their possible nutritional competition with *Porphyromonas gingivalis*. J Appl Microbiol 2007;103(5):1969-74.
107. Anderson MT, Armstrong SK. Norepinephrine mediates acquisition of transferrin-iron in *Bordetella bronchiseptica*. J Bacteriol 2008;190(11):3940-7.
108. Nakano M, Takahashi A, Sakai Y, Kawano M, Harada N, Mawatari K, Nakaya Y. Catecholamine-induced stimulation of growth in *Vibrio* species. Lett Appl Microbiol. 2007;44(6):649-53.
109. Chia JS, Lee YY, Huang PT, Chen JY. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. Infect Immun 2001;69(4):2493-501.
110. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic acids research 2002;30:36.
111. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research 2001;29:45.
112. Jentsch HFR, März D, Krüger M. The effects of stress hormones on growth of selected periodontitis related bacteria. Anaerobe 2013;24:49-54.
113. Akcali A, Huck O, Buduneli N, Davideau Jean-Luc et al. Exposure of *Porphyromonas gingivalis* to cortisol increases bacterial growth. Archives of Oral Biology 2013b;58(9):1-18.
114. Peterson PK, Chao CC, Molitor T, Murtaugh M, Strgar F, Sharp BM. Stress and pathogenesis of infectious disease. Reviews of infectious diseases 1991;13:710-20.
115. Karavolos MH, Winzer K, Williams P, Khan CM. Pathogen espionage: multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. Molecular microbiology 2013;87:455-65.
116. Li L, Xu Z, Zhou Y, Sun L, Liu Z, Chen H, Zhou R. Global effects of catecholamines on *Actinobacillus pleuropneumoniae* gene expression. PLoS One 2012;7(2):e31121.
117. Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med 1998;9:54-85.
118. Ueshima J, Shoji M, Ratnayake DB, Abe K, et al. Purifications, gene cloning, gene expression and mutants of Dps from the obligate anerobe *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 2003;71(3):1170-8.

119. Sandrini SM, Shergill R, Woodward J, Muralikuttan R, Haigh RD, Lyte M, Freestone PP. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. *J Bacteriol* 2010;192(2):587-94.
120. Lepine G, Ellen RP, Progulske-Fox A. Construction and preliminary characterization of three hemagglutinin mutants of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1996;64:1467–72.
121. Belanger M, Kozarov E, Song H, Whitlock J, Progulske-Fox A. Both the unique and repeat regions of the *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin A are involved in adhesion and invasion of host cells. *Anaerobe* 2012;18(1):128-34.
122. Song H, Belanger M, Whitlock J, Kozarov E, Progulske-Fox A. Hemagglutinin B is involved in the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to human coronary artery endothelial cells. *Infection and immunity* 2005;73:7267-73.
123. Curtis MA, Slaney JM, Carman RJ, Johnson NW. Identification of the major surface protein antigens of *Porphyromonas gingivalis* using IgG antibody reactivity of periodontal case-control serum. *Oral microbiology and immunology* 1991;6:321-6.
124. Cogo K, Andrade A, Labate CA et al. Proteomic analysis of *Porphyromonas gingivalis* exposed to nicotine and cotinine. *Journal of periodontal research* 2012;47:766-75.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Patrícia Souza Closs Ferreira

Taubaté, dezembro de 2013.