



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE *Porphyromonas gingivalis* NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM ASMA GRAVE

Isis Carolina de Oliveira Cordeiro¹; Soraya Castro Trindade²; Julia Maria Benites de Jesus³ e Patrícia Mares de Miranda⁴

1. Isis Carolina de Oliveira Cordeiro, PIBIT/CNPq, Graduanda em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isiscarolinaoc@gmail.com
2. Soraya Castro Trindade, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya@uefs.br
3. Julia Maria Benites de Jesus, Participante do NUPPIIM, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: juliabennites@gmail.com
4. Patrícia Mares de Miranda, Participante do NUPPIIM, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: paty_mmiranda@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite, *Porphyromonas gingivalis*, biofilme

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica caracterizada por inflamação das vias aéreas, obstrução do fluxo aéreo e sintomas respiratórios variáveis. A asma grave é caracterizada por sintomas diários com necessidade de medicação broncodilatadora, incapacidade, visitas a emergência, necessidade de cursos repetidos de corticosteróide sistêmico e redução da função pulmonar (Rocha *et al.* 2011). Sua etiologia não é completamente compreendida. Algumas doenças infecciosas crônicas, como as doenças periodontais (Fives-Taylor *et al.* 2000; Torrungruang *et al.* 2009; Fahy, 2015; Gina, 2017), podem influenciar no desenvolvimento da asma, em especial na sua forma grave (Halder *et al.* 2008; Fahy, 2015; Gina, 2017). A periodontite é uma doença inflamatória crônica, de etiologia multifatorial associada à presença de biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparelho de suporte dos dentes, podendo levar à perda dentária e prejuízo na qualidade de vida. (Papapanou *et al.*, 2018). Suas características primárias incluem a perda do osso periodontal de suporte, manifestado através da perda de inserção clínica e perda óssea, quando avaliado radiograficamente, presença de bolsa periodontal e sangramento gengival. A presença de bactérias gram-negativas como a *Porphyromonas gingivalis* (PG), patógeno-chave da periodontite, pode desencadear resposta imune (Santos *et al.*, 2020). Estudo realizado por Gomes-Filho *et al.* (2014) observou que a periodontite pode influenciar o desenvolvimento da asma grave, uma vez que indivíduos com a doença periodontal possuíram chance cinco vezes maior de apresentarem inflamação brônquica, quando comparados a indivíduos sem a infecção. Por se tratarem de duas doenças crônicas com alta prevalência no mundo, o presente trabalho visou padronizar um método de detecção e quantificação relativa de *Porphyromonas gingivalis* no biofilme subgengival por reação em cadeia da polimerase em tempo real, para possibilitar a identificação da infecção periodontal em indivíduos com asma grave.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA

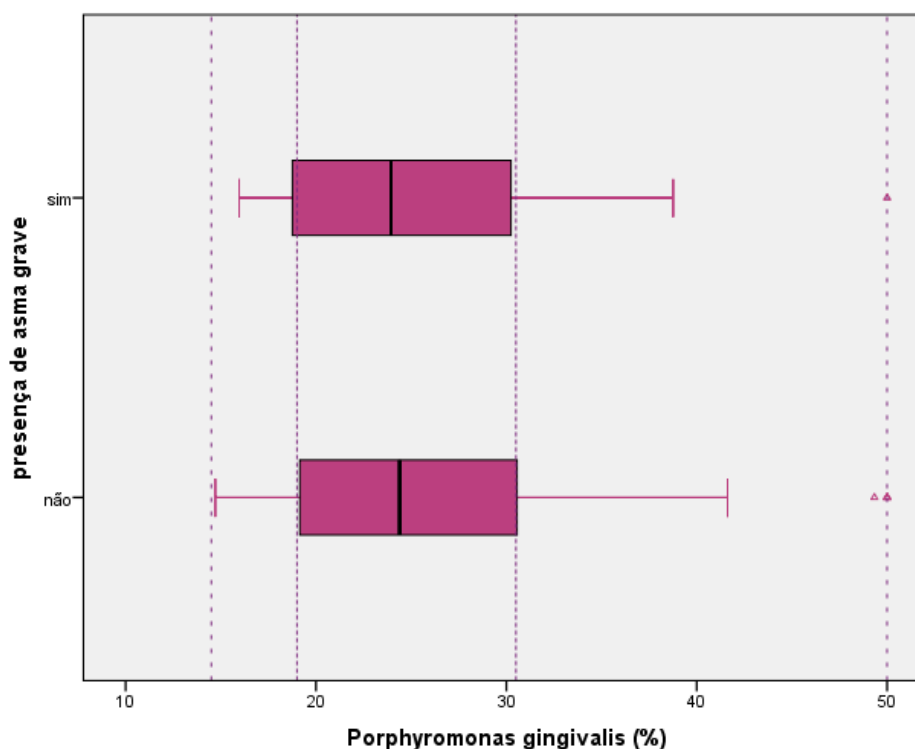
Foram selecionados 53 voluntários com o diagnóstico de asma grave, recrutados na sede do ProAR (Programa de Controle de Asma da Bahia). Para compor o grupo de referência, foram recrutados 116 indivíduos sem a doença. O diagnóstico da asma foi realizado pelos

pneumologistas do ProAR segundo os critérios da Iniciativa Global para Asma (Gina, 2016). Foram incluídos no estudo apenas os pacientes que receberam diagnóstico de asma grave por dois especialistas e uma espirometria. Todos os indivíduos participantes do estudo tiveram um diagnóstico da condição periodontal, avaliados segundo os critérios de Gomes-Filho *et al.* (2007) por um periodontista treinado. O biofilme subgingival foi coletado do sítio com maior profundidade de sondagem de cada sextante e as amostras foram acondicionadas em tampão salina-fosfato estéril. Posteriormente, o DNA bacteriano das amostras de biofilme subgingival foi extraído e a quantificação relativa de PG foi realizada utilizando a técnica de qPCR em tempo real.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A modelagem das sondas obtidas para a quantificação de *Porphromonas gingivalis* resultou na seguinte sequência: 5'- 6-FAM-CRA ACA GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC CRC-BHQ1. As sequências de primer foram: forward 5'- GAC TGA CAC TGA AGC ACG AAG -3' reverse 5'- GCT TGA CGG TAT ATC GCA AAC TC -3'. Para a realização da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi padronizado um volume final de 12,5 µl e foi composta de: tampão 10Xcc (1,25 µL), contendo MgCl₂ 50 mM (0,38 µL), dNTPs 4x2,5 mM (1 µL), forward primer 10 µM (0,38 µL), reverse primer 10µM (0,38 µL), Taq 5U/µL (0,05 µL), água livre de RNase (6,33 µL), sonda 10µM (0,25 µL) e DNA (2,5 µL). As condições da PCR foram as seguintes: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 1 min; e 45 ciclos a 94°C por 20 seg e um ciclo final de anelamento a 58°C por 35 seg.

Com o emprego destas sondas e primers nas condições padronizadas para a técnica de qPCR, foi possível observar uma quantidade elevada relativa de *Porphyromonas gingivalis* em ambos os grupos, com mediana maior no grupo sem asma (mediana: 24,39; IQ: 19,13 - 30,62) do que no grupo de indivíduos com asma grave (mediana: 23,94; IQ: 18,71 - 30,65), porém sem diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos. Houve uma variação individual muito grande na quantidade relativa da bactéria em ambos os grupos, como pode ser evidenciado pelos intervalos interquartis e pelos valores outliers.



A presença de *Porphyromonas gingivalis* no biofilme subgengival (Mayer *et al.* 2013), bem como a produção de anticorpos contra alguns dos seus antígenos (Trindade *et al.* 2008; Trindade *et al.* 2012) tem sido relatada em indivíduos com periodontite, ressaltando o seu papel como patógeno-chave envolvido no processo disbiótico que caracteriza esta doença (Hajishengallis e Lamont, 2014). Entretanto, mesmo com a verificação prévia nesta amostra de associação entre a presença de periodontite, detectada por características clínicas e a asma grave (Miranda *et al.* 2020), a associação entre a presença deste patógeno e o diagnóstico de asma não foi confirmada. Neste mesmo estudo, não houve alteração na produção de IgG específica para *P. gingivalis*. Uma das razões pode ser a relação bidirecional entre periodontite e asma, podendo a doença respiratória estar modulando a comunidade microbiana dentro do biofilme subgengival. Estudos futuros com abordagem metagenômica devem ser desenvolvidos, para a identificação de outros microrganismos que possam ajudar a explicar a plausibilidade da associação entre as duas doenças crônicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As melhores condições de execução da técnica de qPCR para quantificação de *Porphyromonas gingivalis* foram: sonda 5'- 6-FAM-CRA ACA GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC CRC-BHQ1; primer forward 5'- GAC TGA CAC TGA AGC ACG AAG -3' e reverse 5'- GCT TGA CGG TAT ATC GCA AAC TC -3', com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 1 min; e 45 ciclos a 94°C por 20 seg e 58°C por 35 seg.

Não houve diferença na quantidade relativa de *P. gingivalis* no biofilme subgengival de indivíduos com asma grave e indivíduos sem asma.

REFERÊNCIAS

- FAHY, J. V. 2015. Type 2 inflammation in asthma [mdash] present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology*, 15(1): 57-65.
- FIVES-TAYLOR, P.M.; MEYER, D.H.; MINTZ, K.P.; AND BRISSETTE, C. 2000. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol.*
- GINA. 2016. Global initiative for asthma. No Title. Global strategy for asthma management and prevention 2016. p. www.ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/04/wms-.
- GINA. 2017. Estratégia Global para o Controle e Prevenção de Asma, Iniciativa global para a asma. Disponível em: <http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>
- GOMES-FILHO, I.S.; CRUZ, S.S.; PASSOS, J.S.; VIANNA, M.I.P.; CERQUEIRA, E. M.M. et al. 2007. The Association Between Postmenopausal Osteoporosis and Periodontal Disease September. *Journal of Periodontology*. 78 (9):1731-1740.
- GOMES-FILHO, I.S.; SOLEDADE-MARQUES, K.R.; CRUZ, S.S.; PASSOS-SOARES, J.S.; TRINDADE, S.C. et al. 2014. Does Periodontal Infection Have an Effect on Severe Asthma in Adults? *J Periodontol*. 85(6):179-187.
- HALDAR, P.; PAVORD, I.D.; SHAW, D.E.; BERRY, M.A.; THOMAS, M.; BRIGHTLING, C.E. et al. 2008. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 218-224
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. 2014. Breaking bad: Manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Trends in Immunology*. 44: 328-338.
- MAYER, M.P.A.; SUGUIMOTO, E.S.A.; TEIXEIRA, S.R.L. Microbiologia da doença periodontal. In: SPOLIDORIO, D.M.P.; DUQUE, C. 2013. *Microbiologia e imunologia geral e odontológica*. São Paulo: Artes Médicas. 1: 91-99.
- MIRANDA, PM; LOPES, MPP; CRUZ, AA; GOMES-FILHO, IS; MOURA-

- COSTA, LF; FIGUEIREDO, CA; TRINDADE, SC. 2020. Association between Periodontitis and Severe Asthma: The Role of IgG Anti-*Porphyromonas gingivalis* Levels. GJMR-J. v. 20.
- PAPAPANOU, P.N.; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; DIETRICH, T.; FERES, M.; FINE, D.H. et al. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Clin Periodontol. 45(20):S162-S170.
 - SANTOS, R.P.B.; CARVALHO-FILHO, P.C.; SAMPAIO, G.P.; SILVA, R.R.; FALCAO, M.M.L.; PIMENTEL, A.C.M.; OLIVEIRA, Y.A.; MIRANDA, P. M.; SANTOS, E.K.N.; MEYER, R.; TRINDADE, S.C. 2020. In vitro immunomodulatory effect of linalool on *P. gingivalis* infection.. GLOBAL JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH, v. 20, p. 7-16.
 - TORRUNGRUANG, K.; BANDHAYA, P.; LIKITTANASOMBAT, K; E GRITTAYAPHONG, C. 2009. Relationship between the presence of certain bacterial pathogens and periodontal status of urban Thai adults. J Periodontol. 80: 122-129.
 - TRINDADE, S.C.; GOMES-FILHO, I.S.; MEYER R.J. et al. 2008. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. J Int Acad Periodontol. 10(2): 50-58.
 - TRINDADE, S.C.; OLCZAK. T.; GOMES-FILHO, I.S. et al. 2012. *Porphyromonas gingivalis* antigens 8 differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. Archives of Oral Biology. 57: 314–320.
 - ROCHA, K.; MARQUES, S.; SOUZA-MACHADO. 2011. Periodontal disease and asthma: literature review. Med Biol. 10(103):263–269.