

#126. Nova estratégia para detetar e localizar patogénicos periodontais: a técnica de PNA-FISH



Luzia Mendes*, Rui Rocha,
Andreia S. Azevedo, Mariana Henriques,
Miguel G. Pinto, Nuno F. Azevedo

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, LEPABE – Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy FEUP, LIBRO – Laboratório de Investigação em Biofilmes Rosário Oliveira, Universidade do Minho

Objetivos: A compreensão da dinâmica periodontal biofilme-hospedeiro, in situ, é crucial para melhorar o diagnóstico e definir tratamentos mais racionais e eficazes. Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de sondas de ácido peptídico nucleico (PNA), um mimico do DNA, para a identificação e localização de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) e *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) em amostras de placa subgingival e biópsias gengivais, pelo método de hibridação fluorescente in situ (FISH).

Materiais e métodos: Foi desenhada uma sonda de PNA para cada microrganismo. Para tal, oligonucleotídeos com 15 pares de bases com elevada sensibilidade e especificidade, entre outras características, foram identificados recorrendo ao programa Primerose acoplado à base de dados de rRNA 16S do RDP-II. As sequências selecionadas foram sintetizadas (PANA-GENE, Coreia do Sul). O método PNA-FISH foi otimizado em laboratório para permitir a hibridação simultânea das sondas (PNA-FISH multiplex). Depois de testado em estirpes representativas de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, o método de PNA-FISH foi adaptado para a deteção de microrganismos na placa subgingival e biópsias gengivais de pacientes com periodontite grave.

Resultados: As melhores condições de hibridação para as 2 sondas (PgPNA1007 e AaPNA235) foram alcançadas à temperatura de 59 °C, durante 150 minutos. A sensibilidade e especificidade in silico foram ambas de 100% para a sonda PgPNA1007 e de 100 e 99,9% para a sonda AaPNA235, respetivamente. Ambas apresentaram um desempenho teórico superior a sondas de DNA desenvolvidas até à data. A aplicação da técnica a amostras de placa bacteriana subgingival revelou ausência de *A. actinomycetemcomitans* na nossa

amostra. A *P. gingivalis* mostrou-se presente e exibiu ocasionalmente uma organização em microcolónias. Os resultados em biópsias de tecido gengival mostraram que as sondas AaPNA235 e PgPNA1007 foram capazes de detetar, discriminar e colocalizar ambas as espécies. Foi interessante observar a existência de células epiteliais superinvasadas por *P. gingivalis* a contrastar com células não invadidas ou pouco invadidas.

Conclusões: Esta investigação apresenta um novo método para discriminar e colocalizar *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* em amostras clínicas, em apenas algumas horas. Com esta técnica foi possível observar, pela primeira vez, a distribuição espacial simultânea destas espécies em biópsias de tecido gengival organizado, pela técnica de FISH.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpemd.2016.10.123>