

# NOVA ESTRATÉGIA PARA DETETAR E LOCALIZAR PATOGÉNICOS PERIODONTAIS: A TÉCNICA DE PNA-FISH

Luzia Mendes<sup>1</sup>, Rui Rocha<sup>2,3</sup>, Andreia S. Azevedo<sup>2</sup>, Mariana Henriques<sup>3</sup>, Miguel G. Pinto<sup>1</sup>, Nuno F. Azevedo<sup>2</sup>

## INTRODUÇÃO

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 mímico do DNA, para a identificação e localização de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em amostras de placa subgingival e biópsias gengivais, pelo método de hibridação *in situ* fluorescente (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 (PANAGENE, 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* e *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 duas 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 co-localizar ambas as espécies. Foi interessante observar a existência de células epiteliais super-invasidas por *P. gingivalis* a contrastar com células não invadidas ou pouco invadidas.

## CONCLUSÃO

Esta investigação apresenta um novo método para discriminar e co-localizar *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.

