

SÉRGIO EDUARDO BRAGA DA CRUZ

**ANÁLISE BIOMOLECULAR DE COMUNIDADES
MICROBIANAS SUBGENGIVAS ASSOCIADAS ÀS
PERIODONTITES CRÔNICA E AGRESSIVA
GENERALIZADAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Biologia Buco-Dental, área de Microbiologia Oral e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Saito

PIRACICABA, 2010

UNIDADE BC
Nº CHAMADA _____
T/UNICAMP 288
V _____
TOMBO B 87232
PROC. 16.139.10
C _____
PREÇO R\$ 1,00
DATA 17-08-10
CÓD. TIT. 990881

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C889a Cruz, Sérgio Eduardo Braga da.
Análise biomolecular de comunidades microbianas subgingivais associadas às periodontites crônica e agressiva generalizadas / Sérgio Eduardo Braga da Cruz. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Reginaldo Bruno Gonçalves, Daniel Saito.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Biofilme. 2. Clonagem molecular. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno. II. Saito, Daniel. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Biomolecular analyses of subgingival microbial communities from generalized chronic and aggressive periodontitis

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Biofilm. 2. Molecular cloning

Área de Concentração: Microbiologia Oral e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Reginaldo Bruno Gonçalves, José Francisco Höfling, Francisco Humberto Nocitti Junior, Daniela Corrêa Grisi, Marcelo Henrique Napimoga

Data da Defesa: 07-06-2010

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 07 de Junho de 2010, considerou o candidato SÉRGIO EDUARDO BRAGA DA CRUZ aprovado.

Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

Profa. Dra. DANIELA CORRÊA GRISI

Prof. Dr. MARCELO HENRIQUE NAPIMOGA

Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HOFLING

Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

Dedico este trabalho aos meus pais Marilene e João Batista que sempre me apoiaram em todos meus momentos e decisões e por todo amor que sempre me deram. Vocês serão sempre exemplos de vida, dignidade, luta e honra!

Às minhas irmãs Monalisa e Renata Karina pela amizade, carinho e amor.

Muito obrigado! Eu vos amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por cada dia a mim oferecido e pelas oportunidades que tenho a cada dia para crescer e aprender.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, meus sinceros e eternos agradecimentos pela orientação, pelo exemplo de batalha profissional, e por todo apoio aqui no Brasil e no Canadá.

Ao Prof. Dr. Daniel Saito por todo apoio, co-orientação, ensinamentos e ajuda durante o meu doutorado.

Ao Prof. Dr. José Franciso Höfling pelos ensinamentos e conhecimentos laboratoriais e por todo apoio oferecido.

À Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Mattos-Graner pelos conhecimentos repassados, pela orientação durante o meu programa de estágio docente (PED) e por todo apoio.

Ao Rafael Nóbrega Stipp pela amizade, companheirismo, exemplo profissional, por todos os ensinamentos na área de biologia molecular e microbiologia e, obviamente, pelos grandes momentos de churrascos que em muito fizeram minha história aqui em Piracicaba.

À Cristiane Duque, Flávia Sammartino Mariano, Iza Peixoto, Janaína de Cássia Barbosa Orlandi Sardi, Paula Anibal e Regianne Kamiya com as quais tive ótimos momentos trabalhando e aprendendo junto, troca de conhecimentos e experiências de vida, pelo carinho e pela amizade, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Márcio Zaffallon Casati por gentilmente ceder as amostras de biofilme subgengival utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin e à Prof^a. Dr^a. Érica del Peloso Ribeiro a quem muito devo por toda ajuda e amizade e pelo material de análise.

À Maria Paula Rando Meireles pela amizade, bons momentos e ajuda incansável e determinada durante os preparos dos géis dos nossos trabalhos.

À Prof^a Dr^a Siu Mui Tsai que em muito me apoiou disponibilizando seu laboratório e equipe para a realização deste trabalho.

Ao mestre biólogo Acácio A. Navarrete por toda ajuda, competência, ensinamentos sobre o DGGE e análise de géis, sem os quais nunca teria realizado este trabalho.

À Prof^a. Dr^a María Lucila Hernández Macedo pelo carinho, ajuda e ensinamentos sobre o equipamento e métodos de trabalho com o DGGE.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques por toda ajuda na faculdade, ensinamentos na área de biologia molecular, pela amizade e companheirismo.

Aos meus colegas e amigos da FOP Ítalo Sarto Rodrigues, Fernando Tadeu Zamuner, Gustavo Obando, Julianna Joanna de Moraes, Natalia Vizoto, Erika Harth, Andressa, Tiago Taiete, Thais Oliveira, Victor, Wilma e Anderson pelo companheirismo e por todos os ótimos momentos no laboratório e fora dele.

Ao Cássio do Nascimento pelo coleguismo, ajuda e amizade em vários momentos durante o estágio no exterior.

Ao José Roberto Pereira e ao André Barbagallo por toda ajuda, pelo companheirismo e amizade e pelos exemplos de luta, determinação e sucesso para alcançar seus sonhos.

À Prof^a. Dr^a. Fatiha Chandad pelo apoio e auxílio durante o estágio na Université Laval e à toda equipe e colegas do Groupe de Recherche en Écologie Buccale da Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval.

Ao responsável do laboratório de pesquisa do CHUL/CHUQ Marc-André Rodrigue, à Sylvie Desjardins, e toda a equipe do serviço de sequenciamento do CHUL/CHUQ pela competência, atenção e serviço prestados.

Ao Jacques e à Sylvie, pelos bons momentos e ajuda no meu primeiro mês ao Canadá.

À professora de Marie-Andrée pelos ensinamentos e bons momentos em Québec.

Aos professores César e Myriam por todos os ensinamentos da língua francesa e que me ajudaram muito para melhor aproveitar meu estágio.

Aos tantos e queridos amigos de Québec e da residência Alphonse-Marie-Parent pelos ótimos momentos, experiências e culturas trocadas.

À Juliana Pucci de Moraes com quem dividi meus melhores e piores momentos, com quem cresci e aprendi bastante. Por todo amor compartilhado, muito obrigado, pra sempre!

À minha prima Thais Mageste Duque pelo companheirismo, amizade, experiência de vida e apoio moral durante boa parte de minha estadia aqui.

A todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho e com meu engrandecimento pessoal e profissional, meus sinceros agradecimentos.

*"Não há maior sinal de loucura do que
fazer uma coisa repetidamente e esperar a
cada vez um resultado diferente."*

Albert Einstein

*"Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!"*

Mário Quintana

RESUMO

INTRODUÇÃO-Há um consenso que outros micro-organismos além de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia* (Tf) e *Treponema denticola* (Td) estariam correlacionados às periodontites, inclusive algumas espécies ainda não identificadas. Nosso objetivo foi estudar as microbiotas subgingivais de indivíduos com periodontite crônica generalizada (PCG) e periodontite agressiva generalizada (PAG) para avaliar diferenças entre suas microbiotas. **MATERIAL E MÉTODOS**-Foram selecionados 15 indivíduos com PCG e 14 com PAG. Coletou-se amostra do biofilme subgingival de uma bolsa periodontal profunda (BP-PS \geq 7mm) e uma moderada (BM – PS entre 5 e 6 mm) de cada indivíduo. Foi preparado e analisado, por meio de DGGE, o perfil bacteriano entre os grupos. A similaridade e a análise de *cluster* do padrão de UTO's foram verificadas utilizando-se coeficiente de Jaccard e a construção do dendrograma realizada por UPGMA. Realizou-se também análise clonal direta de 10 amostras de BP de cada grupo e as sequências foram agrupadas em táxons com similaridade $>97\%$. **RESULTADOS**-DGGE - No perfil de DGGE foi observada uma tendência para a formação de grupos em BP, mas não em BM, com a presença de dois grupos maiores e distintos de oito indivíduos tanto para PCG como PAG, com variação de similaridade intra-grupo entre 53,6-68,4% e 50,2-64,7%, respectivamente. **Análise clonal** - Foram identificados 109 táxons conhecidos a partir de 987 clones. Ao todo 44 gêneros bacterianos, 28 gêneros comuns aos dois grupos, nove que se apresentaram apenas para PCG e sete para PAG. Entre os dois grupos foram observados 34 táxons comuns, sendo 42 específicos para PAG e 37 para PCG. A espécie Tf foi detectada em 90% dos indivíduos com PCG e 80% com PAG, Pg foi detectada em 70% com PCG e 50% com PAG e Td foi detectada em 40% com PCG e 30% PAG. A espécie Aa foi encontrada em somente 20% de PCG e 30% de PAG. A espécie *Filifactor alocis* foi observada em altas taxas e prevalência em PCG (58 clones, 90%) e PAG (91 clones, 90%). As espécies encontradas exclusivamente por grupo com prevalência acima de dois pacientes foram: PCG: *Treponema lecithinolyticum*, *Selenomonas diana*, *Prevotella pleuritidis*, *Dialister pneumosintes*; e para PAG: *Fusobacterium nucleatum ss vincentii*, *Veillonella parvula*, *Peptococcus sp.* Cepa GEA8, *Streptococcus gordonii*, *Lautropia mirabilis*, *Gemella sanguinis*, *Afipia broomeae*. Para os filotipos, PCG: *Peptostreptococcaceae sp.* Clone-MCE10_174, *Fusobacterium sp.* C-I035, *Veillonellaceae sp.* C-JS031; PAG: *Peptostreptococcaceae sp.* C-PUS9170, *Treponema sp.* C-G093. Apesar de não haver exclusividade entre grupos, é de nota os filotipos *Synergistes sp.* clone W028 (80% e 60%) e o clone D084 (70% e 10%) em PCG e PAG, respectivamente. O filotipo *Bacteroidetes sp.* AU126 foi encontrado tanto em PCG (60%) como PAG (30%). **CONCLUSÃO** - O presente trabalho demonstrou por meio de DGGE uma tendência a um perfil microbiano comum entre a maioria das amostras estudadas, entretanto, sem seu completo delineamento como dois grupos distintos microbiologicamente. A análise clonal, apesar de algumas espécies específicas entre grupos, demonstrou pequenas diferenças, sem, entretanto, delinear grupos microbiologicamente específicos.

Palavras-chave: periodontite, biofilme subgingival, DGGE, clonagem, 16SrDNA

ABSTRACT

INTRODUCTION - There is an agreement that not only the already known periodontopathogens, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia* (Tf) and *Treponema denticola* (Td) would be involved in periodontitis, but also some others micro-organisms not-yet-identified. The scope of this study is to compare the subgingival microbiota in generalized chronic periodontitis (GCP) or generalized aggressive periodontitis (GAP) subjects. **MATERIAL AND METHODS** – 15 subjects with GCP and 14 with GAP were enrolled. One subgingival biofilm sample from a periodontal deep pocket (DP) with PD \geq 7mm and one from a moderate pocket (MP) with PD from 5 to 6 mm were harvested from each subject. The microbial profiles (OTU's) were compared between groups by DGGE and the similarity OTU profile was analyzed by Jaccard coefficient and the dendrogram and cluster analyses were made by UPGMA. The direct clonal analysis of the 16SrDNA from 10 samples of each group from DP was made. The sequences were grouped in clusters of taxa with > 97% similarity. **RESULTS – DGGE** - It was observed in the profile a tendency for eight subjects from each group to assemble as clusters in the DP, but not for the MP samples, with similarities between 53.6-68.4% (GCP) and 50.2-64.7% (GAP). **Clonal analyses** - One-hundred-and-nine already recognized taxa were obtained from 987 clones. From a total of 44 bacterial genera, 28 were common for both groups; nine were exclusive to PCG and seven to PAG subjects. It was found 34 common taxa between GCP and GAP, 37 were specific for GCP and 42 for GAP. The Tf species was found in 90% from GCP subjects and 80% from GAP subjects, Pg was found in 70% from GCP and in 50% from GAP and Td was detected in 40% from GCP and 30% from GAP. The Aa species were found in only 20% GCP subjects and in 30% from GAP. *Filifactor alocis* species were detected in high prevalence in both GCP (58 clones, 90%) and PAG (91 clones, 90%). The species which were detected exclusively in each group, with 20% prevalence or more were, for GCP: *Treponema lecithinolyticum*, *Selenomonas diana*, *Prevotella pleuritidis*, *Dialister pneumosintes*; and GAP: *Fusobacterium nucleatum ss vincentii*, *Veillonella parvula*, *Peptococcus sp.* Cepa GEA8, *Streptococcus gordonii*, *Lautropia mirabilis*, *Gemella sanguinis*, *Afipia broomeae*. In relation to phylotypes, PCG: *Peptostreptococcaceae sp.* Clone-MCE10_174, *Fusobacterium sp.* C-I035, *Veillonellaceae sp.* C-JS031; PAG: *Peptostreptococcaceae sp.* C-PUS9170, *Treponema sp.* C-G093. Despite not been found exclusively for neither GCP nor GAP, the phylotypes *Synergistes sp.* clone W028 (80% e 60%) and clone D084 (70% e 10%) had a notable presence in GCP and GAP, respectively. The phylotype *Bacteroidetes sp.* AU126 was found in GCP (60%) and GAP (30%) groups. **CONCLUSION** – The present study demonstrated by DGGE a slight tendency to the clustering of the microbial profile of some GCP and GAP subjects, although these were not well delineated. The clonal analyses showed some differences, but also could not show GCP and GAP as microbiologic distinct profiles.

Key-words: periodontitis, subgingival biofilm, DGGE, cloning, 16SrDNA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP – American Academy of Periodontology – Academia Americana de Periodontologia

AIDS – Acquired immunodeficiency syndrome – Síndrome da imunodeficiência adquirida

b – base(s) nitrogenada(s)

BM – Bolsa moderada – bolsa com profundidade de sondagem de 5 a 6 milímetros.

BP – Bolsa profunda – bolsa periodontal com profundidade de sondagem maior ou igual a 7mm.

DGGE ou **PCR-DGGE** – Denaturing gradient gel electrophoresis – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

FISH – *Fluorescent in situ hybridization* – Hibridização fluorescente *in situ*

G+C – Guanina + Citosina

(gene) 16SrDNA – S (Svedberg, unidade de sedimentação) rDNA (*ribosomal Deoxyribonucleic acid*), ácido desoxirribonucléico ribossomal - gene do 16S rRNA

HIV – *Human immunodeficiency virus* – Vírus da imunodeficiência humana

IG – Índice de sangramento gengival

Nested-PCR – PCR feita a partir de amostra de amplicon do produto de outra PCR

OP11 – Filo bacteriano *Obsidian pool* 11 (1998), da fonte termal Obsidian Pool do Parque Yellowstone, EUA

OT ou **TO** – *Oral Taxon* – Táxon oral

OTU ou **UTO** – *Operational taxonomic unit* ou unidade taxonômica operacional

pb – Par(es) de base(s) nitrogenada(s)

PA – Periodontite agressiva

PAG – Periodontite agressiva generalizada

PAL – Periodontite agressiva localizada

PC – Periodontite crônica

PCG – Periodontite crônica generalizada

PCL – Periodontite crônica localizada

PCR – *Polymerase chain reaction* – Reação de cadeia em polimerase

SP – Saúde periodontal.

PS – Profundidade de sondagem

TM7 – Filo bacteriano TM7 (1996), do alemão *Torf, mittlere Schicht* – Turfa, camada intermediária. Turfa - um material de origem vegetal, parcialmente decomposto, encontrado em camadas

UFC – Unidade(s) formadora(s) de colônia(s)

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	2
Início da Microbiologia Periodontal	2
A Nomenclatura das Periodontites e a Revisão de Literatura.	2
Microbiota Subgengival em Indivíduos Portadores de PCG – Diversidade Bacteriana	3
Microbiota Subgengival em Indivíduos Portadores de PAG – Diversidade Bacteriana	7
Microbiota Subgengival em Indivíduos Portadores de PAG ou PCG – Análises Comparativas	8
Diversidade Microbiana - Eubacteria do Biofilme Dental	12
Técnicas de Biologia Molecular no Auxílio do Estudo da Diversidade Microbiana	17
DGGE – Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação	18
Estudos da Microbiota Subgengival por Meio de PCR-DGGE	19
3 - PROPOSIÇÃO	21
4 - MATERIAL E MÉTODOS	22
PROCEDIMENTOS CLÍNICOS REALIZADOS	22
Seleção e coleta de amostras de biofilme subgengival	22
PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS REALIZADOS	23
Purificação de DNA das amostras	23
Padronização dos oligonucleotídeos iniciadores para 16SrDNA para PCR convencional	24
Padronização das Reações de Nested-PCR	25
Nested-PCR das Amostras de Periodontites Crônica e Agressiva para DGGE	27
Preparo das soluções do gel de gradiente de desnaturação	28
Preparo dos géis de poliacrilamida	28
Preparo das amostras de periodontite crônica e agressiva para DGGE	28
Eletroforese do gel com gradiente de desnaturação	29
Coloração e fotodocumentação dos géis	29
Normalização das bandas da imagem digitalizada	29
Leitura das bandas e contagem	30
Dendrograma e similaridade	30
Clonagem do gene 16SrDNA das amostras de periodontite crônica e agressiva	30
Clonagem dos fragmentos de PCR amplificados	31
5 - RESULTADOS	33
Análise estatística do número de bandas dos géis	33
Análise do DGGE	33
Construção de dendrogramas de similaridade intergrupo dos perfis de UTO's das amostras	34
Resultados Clonagem e Sequenciamento	37
6 - DISCUSSÃO	46
Avaliação sobre as Amostras de Biofilme Subgengival por DGGE	46
Avaliação dos Dados por Análise Clonal do Gene 16SrDNA	50
7 - CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS*	59
ANEXO 01 – Tabela 05	70
ANEXO 02 – Tabela 06	71
ANEXO 03 – Tabela 07	72
ANEXO 04 – Tabela 08	73
ANEXO 05 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa	74

1 - INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa de patogênese complexa que se caracteriza clinicamente pela destruição do aparato de inserção do dente ao osso alveolar, podendo evoluir até a perda do dente, e que possui como fator etiológico o biofilme dental. Começa a haver um consenso na literatura atual que não somente os poucos micro-organismos considerados periodontopatógenos clássicos (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) estariam correlacionados à periodontite, mas, sim, que outras espécies, inclusive algumas pouco estudadas ou não identificadas, poderiam estar associadas com o início e evolução desta patologia, além disto, a interação entre espécies pode promover o desenvolvimento de um biofilme dental patogênico.

Em 1999 a Academia Americana de Periodontia apresentou um consenso sobre a classificação das doenças periodontais; entretanto, até os dias de hoje, o diagnóstico ainda é um desafio para o clínico, pois ainda se desconhece os fatores etiológicos. Nesse interim, há ainda uma escassez de estudos controlados, na literatura, que diferenciam os dois principais quadros clínicos de periodontopatias, periodontite crônica generalizada (PCG) e periodontite agressiva generalizada (PAG) no que tange a sua microbiota.

Estima-se que apenas algo em torno de 50% das bactérias presentes nas mucosas bucais e biofilmes dentais foram já cultivadas. Estudos recentes estimam a possível ocorrência de até 415 táxons (espécies ou filotipos) no biofilme subgingival. Técnicas de biologia molecular têm sido de grande valia na detecção de espécies de difícil cultivo ou não-cultiváveis, sendo a técnica de referência baseada na clonagem e sequenciamento do gene 16SrDNA. Uma técnica biomolecular para separação de sequências gênicas de mesmo tamanho conhecida por DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), tem sido utilizada na comparação de perfis da microbiota em diversos campos, inclusive da Odontologia.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

Início da Microbiologia Periodontal

Sugere-se que o reconhecimento das doenças periodontais como patologias e suas classificações datam de mais de 5.000 anos atrás por meio de escrituras egípcias e chinesas (Gold, 1985). Entretanto, sua associação com a microbiota bucal possui uma história relativamente recente.

Em uma carta de Antonj van Leeuwenhoek (nome de batismo - Thonis Philipszoon) de 17 de Setembro de 1683 à Royal Society of London descreve a presença de “*animalcules*” no biofilme dental de dois homens que, segundo ele, nunca haviam escovado os dentes, duas mulheres (possivelmente sua segunda esposa e filha) e de seu próprio biofilme, sem, entretanto, correlacioná-los às doenças periodontais ou dentárias de uma forma clara (Tal, 1980), mas explicou que com a manutenção de seus dentes não havia sangramento da gengiva mesmo após esfregá-la com sal e que pessoas na sua idade (51) dificilmente possuíam qualidade dentária como a dele. Apenas a partir do século XIX, Adolph Witzel associa a presença de bactérias às doenças periodontais (Highfield, 2009). Desde então diversos estudos no intuito de descrever a microbiota relacionada à saúde ou quadros de doenças do periodonto vem sendo realizados.

A Nomenclatura das Periodontites e a Revisão de Literatura.

A caracterização de uma microbiota relacionada aos indivíduos portadores de periodontites agressiva ou crônica ao longo da história da microbiologia periodontal esbarra nas dificuldades em se diferenciar os quadros de doenças periodontais. Atualmente a classificação aceita das doenças periodontais baseia-se nos critérios adotados durante o “International Workshop for Classification of Periodontal Diseases and Conditions” promovido pela Academia Americana de Periodontologia (Armitage, 1999). Entretanto, modelos de classificação apenas começaram a serem adotados apenas após 1966 no “World Workshop in Periodontics” também promovido pela AAP (The American Academy of Periodontology, 1966) sem, no entanto, haver consenso e uso por parte de vários periodontistas, inclusive do meio científico. Mesmo sendo amplamente aceita e apresentar-se bem completa, a classificação atual de 1999

representa apenas um primeiro passo como diagnóstico e comunicação entre profissionais e não possui a pretensão de ser precisa (Armitage & Cullinan, 2010). Todavia, há um porém na classificação atual, que removeu o termo periodontite juvenil localizada como entidade distinta e bem caracterizada, inclusive microbiologicamente, das outras periodontites (AAP, 1989) e o associou a outras periodontites agressivas localizadas.

Com o reconhecimento de que há divergências entre os estudos nos parâmetros clínicos de doença, foi realizada uma revisão da literatura sobre a microbiota subgengival de indivíduos portadores de periodontites crônica e agressiva generalizadas, mantendo-se a nomenclatura original do artigo. Em relação às espécies ou filotipos bacterianos foram utilizadas as nomenclaturas atualmente reconhecidas para a edição deste texto.

Foram utilizadas as seguintes palavras-chave para a pesquisa no sítio eletrônico do NCBI/PubMed para periodontite crônica generalizada (PCG): *adult periodontitis*, *chronic periodontitis*; e para periodontite agressiva generalizada (PAG): *aggressive periodontitis*, *early onset periodontitis*, *rapidly progressive periodontitis*. Os termos ingleses “*generilized*” (estadunidense) ou “*generalised*” (britânico) não foram incluídos na busca e foram verificados no conteúdo e pelo espaço amostral dos artigos. Sendo excluídos os trabalhos que relatam que todos os indivíduos/pacientes do estudo possuíam características que os marcariam como portadores de periodontites localizadas (PCL e PAL) (*i.e.* <30% dos sítios/dentes afetados, apenas primeiros molares e incisivos), ou que não apresentassem os dados clínicos, ou os critérios de inclusão e/ou exclusão para diferenciar os grupos que foram incluídos no estudo. Foram também excluídos os trabalhos que incluíram no todo, ou na maioria (>50%) da população, indivíduos portadores de patologias sistêmicas (*i.e.* diabetes), ou condições/hábitos (*i.e.* tabagismo) que alterem o curso das periodontites.

Microbiota Subgengival em Indivíduos Portadores de PCG – Diversidade Bacteriana

A maioria dos estudos encontrados na literatura, quando diferenciam os indivíduos por idade ou por características que as identificam como periodontite crônica ou agressiva, apresenta sua população de estudo condizente com periodontite crônica ou

do adulto. Portanto, há uma maior facilidade em se considerar algumas espécies correlacionadas com a periodontite crônica ou do adulto, além do fato de que se acredita que esta é mais prevalente que a periodontite agressiva ou juvenil ao redor do mundo (Albandar, 2002; Gjermo *et al.*, 2002). Porém a inconsistência entre os estudos e falta de critérios com relação à seleção ou exclusão de indivíduos podem ser vistas devido às dificuldades inerentes das classificações e diagnósticos.

Dentre as primeiras espécies bacterianas correlacionadas com a periodontite do adulto foi demonstrada a correlação com a presença de bacteróides pigmentadas em negro (bacteróides formadoras de colônias pigmentadas em negro em meio ágar-sangue), espiroquetas, além de outras bactérias Gram-negativas e anaeróbias (Listgarten, 1976; Zambon *et al.*, 1981; Moore *et al.*, 1983). Mais tarde uma das espécies assacarolíticas de bacteróides pigmentadas em negro (*Bacteroides gingivalis*) fora renomeada para *Porphyromonas gingivalis* (van Steenbergem *et al.*, 1989) e fortemente associada com a periodontite do adulto (Zambon *et al.*, 1981).

Em 1983, Moore *et al.* selecionaram 22 indivíduos adultos com periodontite moderada (crônica) entre 30 e 55 anos. Foram retiradas 60 amostras de biofilme subgingival, gerando aproximadamente 1.900 colônias, além de amostras de cada um dos biofilmes supragingivais como controle e mais amostras de biofilme subgingivais de sulco crevicular de 14 indivíduos periodontalmente saudáveis entre 30 a 70 anos. A partir destes isolados, foram encontradas 171 táxons, entre 29 gêneros bacterianos. Dentre as espécies mais encontradas nos biofilmes subgingivais de periodontite moderada que em supragingivais e indivíduos saudáveis estão: *Fusobacterium nucleatum* (76%, prevalência nas amostras), *Parvimonas micra* (*Peptostreptococcus micros*) (50%), *Eubacterium nodatum* (42%), *P. intermedia* - cepa 4197 (37%), *Eubacterium timidum* (39%), *Campylobacter rectus* (39%), *Eubacterium brachy* (32%), *Lactobacillus* D-2 (21%), *Eubacterium* D-11, D-8, D-6 (de 16 a 18%), *P. gingivalis* (13%), *Actinomyces naeslundii* III (13%), *Actinomyces israelii* 1 (16%), *Peptostreptococcus anaerobius* (24%), *Prevotella intermedia* cepa 8944 (13%), *Fusobacterium* RD (26%), *Selenomonas sputigena* (24%), *Campylobacter jejuni* (24%), *Lactobacillus minutus* (21%), *Eubacterium alactolythicum* (13%), *Staphylococcus epidermidis* (13%), *Dialister* (*Bacteroides*) *pneumosintes* (5%),

Prevotella loescheii (11%), *Haemophilus aphrophilus* (11%), *Prevotella oralis* (8%), *Selenomonas D-6* (8%) (algumas espécies não foram encontradas com a nomenclatura atual). Nos indivíduos saudáveis e nos isolados de biofilme supragengival não foram encontradas espécies de *P. gingivalis* e *E. brachy*.

Em outro estudo clássico realizado com indivíduos portadores de periodontite crônica generalizada, Socransky *et al.* (1998) analisaram as associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgengival e definiram cinco complexos bacterianos de acordo com as similaridades por pares e grupos de espécies. Esses complexos foram, assim, organizados em complexo vermelho, composto pelas espécies *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*; complexo laranja, que se mostrou fortemente associado ao complexo vermelho e foi dividido em dois grupos, sendo um central, fortemente relacionado, composto por 3 subespécies de *F. nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *P. micra*; e outro grupo associado a este, formado pelas seguintes espécies: *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Streptococcus constellatus*; complexo verde, composto por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Campylobacter concisus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* sorotipo a; complexo amarelo, formado por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*; e o complexo roxo, que inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As espécies *S. noxia* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b não se correlacionaram com nenhuma outra. As espécies que compõem o complexo vermelho foram fortemente associadas ao sangramento durante a sondagem e às bolsas mais profundas. Posteriormente, algumas espécies do gênero *Actinomyces* (*A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii* 1 e 2) foram agrupadas como complexo azul (Socransky & Haffajee, 2002).

Kumar *et al.* (2005) selecionaram 15 indivíduos portadores de periodontite crônica e 15 indivíduos periodontalmente saudáveis. Foram coletadas amostras subgengivais por meio de cones de papel endodôntico estéreis de todos os sítios do grupo saudável e dos sítios com $PS \geq 6\text{mm}$ do grupo periodontite. Além de quatro sítios com $PS \leq 3\text{mm}$ de cada indivíduo do estudo. Um par de iniciadores de PCR foi utilizado

para a amplificação. A análise clonal foi realizada de 4.500 clones e um total de 274 táxons foram identificados, sendo que seis novos filotipos foram determinados a partir de um ponto de corte menor que 98% de similaridade com o GenBank e sequenciamento das ~1500 bases. Os autores não citam, porém, o ponto de corte de similaridade para incluir as sequências em *clusters* de UTO's. Seis filios foram encontrados dentre as amostras. Os filios *Firmicutes* (Classe, *Clostridia*), *Firmicutes* (Classe, *Bacilli*) e *Deferribacteres* (incluído o atual filo *Synergistetes*) estiveram mais associados com indivíduos portadores de periodontite. Outros filios tais como *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* e *Fusobacteria* também foram encontrados. Este grupo também obteve uma proporção de 60% para as bactérias ainda não cultivadas (filotipos).

Vartoukian *et al.*, 2009, selecionaram cinco indivíduos com periodontite crônica generalizada e cinco com saúde periodontal (SP). Um sítio de cada quadrante foi escolhido. Nos indivíduos saudáveis, foram coletadas amostras de quatro dos sítios com PS \leq 3mm, sem sangramento e dos indivíduos com periodontite, quatro sítios com PS \geq 6mm e 4 com PS \leq 3mm. Foram coletadas amostras de saliva e do dorso lingual dos indivíduos. Os autores buscaram por representantes do filo *Synergistetes* por métodos de análise clonal para 16SrDNA específico (1.664 clones) para *Synergistetes* e sondas para as células por FISH (*fluorescent in situ hybridization*). Foi encontrado que *Synergistetes* do grupo para o OTU 4.2 (clone A2F_22) foi estatisticamente mais prevalente em indivíduos com periodontite e mesmo em sítios com PS \geq 6mm em relação aos sítios com PS \leq 3mm (valor-p = 0,019). Quando este grupo foi associado com o grupo 4.1 (clone JV023), continuou a se apresentar estatisticamente significativo (valor-p = 0,048). Quando observado a prevalência ou proporção de *Synergistetes* indiferente se a comparação se referia aos sítios ou aos grupos PCG e SP também só houve diferença estatisticamente significativa para o grupo 4.2 (valor-p<0,05). Com relação ao percentual de cada grupo de *Synergistetes* sobre o total deste filo nos grupos PCG e SP, fora observada, sem diferença estatística ($\alpha=0,05$), uma maior proporção dos grupos 1 (BH017 e JV006), 2 (A6A_39), 3.1 (A2G_10), 3.2 (A3G_2), 3.3 (BH007), 4.1 e 4.3 (MCE7_5).

Microbiota Subgengival em Indivíduos Portadores de PAG – Diversidade Bacteriana

Kamma *et al.* (1994) realizaram uma avaliação microbiológica de 73 amostras de 10 indivíduos portadores de periodontite de rápida progressão com idade entre 25 a 35 anos. Nos sítios periodontais com PS > 6mm prevaleceram as presenças de *P. gingivalis*, em 26,7% das amostras, seguido por *T. forsythia* (23,6%) e *P. intermedia* (15,7%). A prevalência de *P. gingivalis* foi de 91,7%, *F. nucleatum*, 90,4%, *S. intermedius*, 87,7%, e *T. forsythia* 53,4%. Os autores encontraram uma maior frequência nos sítios com sangramento gengival ($p < 0,05$) para *P. intermedia*, *C. concisus*, *S. sputigena* e *P. micra* e os sítios com índice zero tiveram uma maior frequência ($p < 0,001$) de *S. sanguinis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia*. Os sítios com supuração apresentaram maior prevalência de *P. intermedia*, *Capnocytophaga ochracea* e *A. actinomycetemcomitans* e os sítios sem supuração *F. nucleatum* ($p < 0,05$).

Em um estudo que incluiu uma população da Grécia para avaliação da microbiota bucal de 66 indivíduos portadores de periodontite de progressão rápida com idade até 35 anos e sistemicamente saudáveis, Kamma *et al.* (2004) examinaram por meio de técnicas de cultura, bioquímica e imunofluorescência a presença de 34 espécies bacterianas e dois fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*). Fora examinada uma amostra de biofilme subgengival (do sítio periodontal com maior PS) de cada quadrante dos indivíduos, obtendo 264 amostras. Trinta e três indivíduos (50%) eram tabagistas. As 34 espécies foram encontradas em proporções acima de 1% das UFC's. Outras cinco espécies foram isoladas sem entretanto atingir a proporção de 1% (*Veillonella atypica*, *Leptotrichia buccalis*, *S. noxia*, *Propionibacterium propionicus* e *Bilophila wadsworthia*). As espécies encontradas nas maiores proporções (>10% dentro das placas de cultivo para cada espécie ou grupo de bactérias) e frequência entre as amostras foram: *P. intermedia*/*P. nigrescens*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *S. sanguinis*. A espécie *A. actinomycetemcomitans* foi encontrada em 25% dos sítios e 33% dos indivíduos e obteve uma proporção de 2,7 a 11,9% das colônias presentes nas culturas. Foram observadas as associações entre as principais espécies identificadas. A associação entre *T. forsythia* e *C. rectus* teve o maior Odds

Ratio, 109; *T. forsythia* e *P. gingivalis*, 90,26; *T. forsythia* e *P. micra*, 16,13; *P. gingivalis* e *C. rectus*, 9,48; *P. micra* e *C. rectus*, 5,45; *P. intermedia/P. nigrescens* e *P. micra*, 4,83. Com relação à presença de *A. actinomycetemcomitans* nos sítios (quatro por indivíduo), a espécie foi encontrada conjuntamente à *P. gingivalis* e *T. forsythia* nos quatro sítios de um indivíduo (n=3), em três sítios (n=3), dois sítios (n=1), um sítio apenas (n=26), porém *A. actinomycetemcomitans* obteve uma associação negativa com a presença de *P. intermedia/P. nigrescens*, OR=0,42.

Faveri *et al.* (2008) analisaram a diversidade microbiana de 10 indivíduos com PAG por meio de análise clonal do gene 16SrDNA. Um total de 1007 clones a partir de um par de iniciadores (9F/1525R) de PCR foram obtidos e analisados. Um nível de 98,5% de similaridade foi utilizado como ponto de corte entre as UTO's para determiná-las como um táxon específico. Foram reconhecidos 110 táxons, sendo 70 desses detectados mais de uma vez. Desse total de 70 táxons, 57% foram reconhecidos como ainda não cultivados. Foram encontradas espécies e filotipos dentro dos seguintes filos: *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*. Não foi encontrado por análise clonal nenhum representante da espécie *A. actinomycetemcomitans*. Para encontrá-lo foi realizada PCR espécie-específica. Desta forma, foi possível observar, neste estudo, que sete dos dez indivíduos eram positivos para *A. actinomycetemcomitans*. Uma quantidade expressiva de clones e representantes (19 diferentes filotipos e quatro espécies) do gênero *Selenomonas* foi observado em todos os indivíduos do estudo. Além dos representantes do gênero *Selenomonas*, uma frequência igual ou maior que 40% foi também observada para os seguintes táxons: *Dialister* sp. BS095, *Anaeroglobus geminatus*, *V. parvula*, *Streptococcus anginosus*, *S. constellatus*, *Streptococcus cristatus*, *S. sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Gemella morbillorum*, *Filifactor alocis*, *Eubacterium infirmum*. Os autores acreditam em uma especial representatividade do gênero *Selenomonas* em relação à etiologia da periodontite agressiva generalizada.

Microbiota Subgengival em Indivíduos Portadores de PAG ou PCG – Análises Comparativas

Em um dos primeiros trabalhos comparativos da microbiota periodontal entre indivíduos com periodontite do adulto, periodontite de acometimento precoce,

periodontite juvenil localizada, além de saudáveis, Loesche *et al.* (1985) observaram por microscopia 400 amostras de biofilme subgengival de 110 pacientes além de técnicas de cultivo e avaliação bioquímica de 30 parâmetros bacterianos. Em todos os grupos com periodontite (exceto para PJL) a maioria das contagens microscópicas era para espiroquetas. Nos indivíduos com periodontite do adulto uma média de 45% da contagem microscópica era de espiroquetas e para o grupo de periodontite de acometimento precoce chegou a 49% em dois indivíduos, porém em sua maioria obteve maiores proporções de *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Os autores concluem que em todas as categorias de periodontites, com exceção da periodontite juvenil localizada a microbiota dos indivíduos era formada, na maior parte, por anaeróbios estritos envolvendo principalmente espiroquetas e em uma menor extensão *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Os indivíduos tratados e com saúde periodontal possuíam uma maior contagem de *S. sanguinis*, *A. viscosus*, *A. odontolyticus* e *S. mutans* e proporções significativamente menores de *P. gingivalis* e espiroquetas em relação aos indivíduos não tratados periodontalmente.

No estudo de uma população chilena Gajardo *et al.* (2005) compararam por métodos de cultura associados a métodos bioquímicos de identificação a presença e contagem (UFC/mL) de algumas espécies bacterianas entre indivíduos portadores de periodontite crônica generalizada (N=17), periodontite agressiva generalizada (N=6) e localizada (N=30). Foram coletadas, por meio de cones de papel estéreis, quatro amostras (uma de cada hemiarcada) de sítios com PS > 5mm, realizado um *pool* das amostras em RTF e cultivadas em meios seletivos e não-seletivos. Todas as oito espécies foram encontradas em todos os grupos. Exceto pela espécie *Campylobacter rectus*, que obteve diferença estatística entre os grupos ($p=0,036$), apenas 23% de frequência entre os indivíduos com PCG e 50% entre os indivíduos com PAL e PAG, as outras espécies estudadas não se apresentaram com diferenças na frequência nem na proporção de UFC/mL entre os grupos. A espécie *P. gingivalis* teve uma frequência maior de achados entre os indivíduos com PAG do que PCG (100% e 76,47%, respectivamente). Para as espécies *P. intermedia/Prevotella nigrescens* e *F. nucleatum* houve uma frequência maior, porém não significativa, de achados entre PCG (35, 29% e 41,18%) do que em PAG (16,66% e 33,33%). As outras espécies (*A.*

actinomycetemcomitans, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* sp. e *P. micra*) apresentaram valores de frequências muito próximos. Interessante observar que nesta população estudada, mesmo no grupo de PAL (idades entre 17-26 anos) houve uma proporção da contagem (% do CFU/mL total) de *A. actinomycetemcomitans* menor, porém não significativa, em relação à PCG e apenas um pouco maior que PAG ($0,67 \pm 1,97$; $1,63 \pm 3,37$; $0,25 \pm 0,55$).

Picolos *et al.* (2005) calcularam o padrão de infecção de indivíduos com PAG (N=19), PAL (N=15), PCG (N=12) e PCL (N=11) por meio de *checkerboard* DNA-DNA *hybridization* e títulos de anticorpos IgG para quinze espécies (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. micra*, *S. intermedius*, *Eubacterium nodatum*, *C. rectus*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *A. naeslundii*, *Veillonella parvula*, *C. ochracea*, *E. corrodens*). Segundo os autores não foi possível determinar diferenças pelo padrão de infecção entre os grupos.

Ximenez-Fyvie *et al.* (2006) avaliaram a microbiota subgengival de 19 indivíduos mexicanos com PAG, 39 com PCG e 19 periodontalmente saudáveis (SP) para 40 espécies bacterianas por meio da técnica semi-quantitativa de *checkerboard* DNA-DNA *hybridization*. Foram coletadas amostras do biofilme subgengival de até 28 dentes de cada indivíduo. As espécies que apresentaram o maior nível médio de contagem para os três grupos foram: *A. naeslundii* 1, *A. viscosus*, *Corynebacterium matruchotii*, *P. micra* e *V. parvula*. Os indivíduos do grupo PAG tiveram níveis médios maiores para *Actinomyces israelii*, *Campylobacter showae*, *Neisseria mucosa*, *Porphyromonas endodontalis*, *Propionibacterium acnes*, *Selenomonas* spp. e todos os *Streptococci* testados, exceto para *S. sanguinis* em relação ao grupo PCG. Os níveis de *A. actinomycetemcomitans* não apresentaram diferenças entre os grupos (PAG = $0.5 \pm 0.2 \times 10^5$; PCG = $1.2 \pm 0.4 \times 10^5$; SP = $0.3 \pm 0.1 \times 10^5$ – valores expressos em total de sondas de DNA hibridizadas). A espécie *A. actinomycetemcomitans* também esteve entre as de menor contagem das 40 espécies testadas. As espécies *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* (associados ao complexo vermelho de bactérias nestes estudos relacionados ao *checkerboard* DNA-DNA *hybridization*) compreenderam 18,01% e 16,98% dentro da contagem total de bactérias para os grupos PCG e PAG, respectivamente. Não foram

encontradas diferenças estatísticas entre as 40 espécies para os grupos relacionados às periodontites, apenas entre esses grupos e indivíduos periodontalmente saudáveis.

Em um estudo comparativo de uma população da Turquia, Doğan *et al.* (2003) pesquisaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *T. forsythia*, *P. micra* e *P. intermedia/P. nigrescens*. Foram utilizadas técnicas de cultura e bioquímicas para identificação, além de reação da polimerase em cadeia a partir de iniciadores espécie-específicos para *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, além de leveduras. Os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* (a, b, c, d, e, x = não-sorotipável) foram também avaliados com auxílio de AP-PCR e imunodifusão. Os autores analisaram indivíduos com PAL (N=18), PAG (N=17), PCG (N=14) e SP (N=20). Foram encontradas diferenças entre os grupos de periodontite apenas entre os grupos de PAG/PCG e PAL para *T. forsythia* (p=0,004) e *C. rectus* (p=0,002), onde em indivíduos com periodontite localizada houve menor frequência destas espécies. Para *A. actinomycetemcomitans* não houve diferença estatística entre os grupos de periodontite pelos métodos de cultura ou biomolecular, apesar de haver uma tendência de maior frequência desta espécie no grupo de PAL (83%) em relação à PAG (53%) e PCG (50%). Não foram verificadas diferenças entre os indivíduos ou grupos com relação aos diferentes sorotipos.

Foi realizado um estudo sobre uma população colombiana com relação à presença dos principais prováveis patógenos e bastonetes entéricos Gram-negativos (i.e. *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., entre outros) (Javier *et al.*, 2007). Os seguintes grupos foram avaliados: PCG (N=27), PCL (N=41), PAG (N=7), PAL (N=5) e 30 periodontalmente saudáveis. Foi demonstrada uma maior frequência e proporção de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *E. corrodens* entre os indivíduos com PA em relação aos indivíduos com PC (p<0,01). Entretanto, os autores não puderam apresentar se haveria diferença estatística ou não se avaliados apenas PAG e PCG. Houve também uma maior frequência e proporção de bastonetes entéricos nos grupos com periodontite em relação aos periodontalmente saudáveis apesar de não haver diferença estatística.

Faveri *et al.* (2009) avaliaram a microbiota subgingival de 120 indivíduos divididos nos seguintes grupos: PAL (N=15), PAG (N=25), PCG (N=30) e SP (Idade <

20 anos, N=20 e > 25 anos, N=30) para a contagem e proporção de 38 espécies bacterianas pelo método de *checkerboard* DNA-DNA *hybridization*. Os sítios de coleta dos grupos com periodontites foram divididos em PS \leq 3mm, PS entre 4 e 6 mm e PS \geq 7mm. Os sítios de coleta dos indivíduos do grupo SP restringiram-se a PS \leq 3mm. As espécies associadas ao complexo vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*) apresentaram-se em maiores prevalências e contagem nos indivíduos com PAL. As proporções de *A. actinomycetemcomitans* foram maiores nos sítios moderados e rasos dos indivíduos do grupo PAL em relação aos outros grupos, porém esta diferença não foi observada nos sítios profundos. Algumas diferenças isoladas foram observadas entre os grupos de periodontites generalizadas com relação às espécies e PS ($p < 0,05$). Foram observadas contagens maiores de *A. naeslundii* e *S. sanguinis* nos sítios rasos de pacientes de PCG em relação aos de PAG. *Campylobacter gracilis* foi encontrado em maiores níveis no grupo PAG em relação ao grupo PCG nos sítios rasos. Com relação aos sítios moderados as espécies *F. nucleatum polymorphum* e *P. gingivalis* apresentaram maiores níveis no grupo PAG e nos sítios profundos *C. ochracea* foi mais encontrada em PCG e, novamente, *F. nucleatum polymorphum* com maiores níveis em indivíduos do grupo PAG.

Diversidade Microbiana - Eubacteria do Biofilme Dental

Aas *et al.* (2005) selecionaram cinco indivíduos entre 23 e 55 anos sem sinais clínicos de doenças das mucosas orais. Por meio de clonagem e sequenciamento analisaram amostras do dorso da língua, laterais da língua, fundo de vestibulo, palato duro, palato mole, gengiva labial, e tonsilas palatinas coletadas com auxílio de zaragoas de algodão (*swabs*) e biofilme supra- e subgengival por meio de curetas Gracey. Foram cultivados 2.589 clones e preparados a partir dos amplicons de PCR com um par de iniciadores (*primers*). Seis filos bacterianos foram reconhecidos, a citar, *Firmicutes* (Gram-positivos de baixo teor de G+C, dos gêneros *Streptococcus*, *Gemella*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Veillonella*, *Clostridium* e outros relacionados); o filo *Actinobacteria* (alto teor de G+C, como os gêneros *Actinomyces*, *Atopobium*, *Rothia* e outros); *Proteobacteria* (*Neisseria*, *Eikenella*, *Campylobacter* entre outros); *Bacteroidetes* (com espécies de *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, e outros relacionados); *Fusobacteria* (do próprio gênero *Fusobacteria* e espécies de

Leptotrichia), além do filo TM7, do qual não há representantes cultivados. Neste trabalho 60% das bactérias da microbiota bucal foram representadas por filotipos (possíveis espécies ainda não cultivadas). Sendo que dos 2.589 clones foram considerados como diferentes unidades taxonômicas operacionais (UTO's) em suas sequências de aproximadamente 1.500 bases (b) com um ponto de corte de 2% de diferença entre as sequências (aproximadamente 30 bases). Foi obtida, assim, uma estimativa de que haveria mais de 700 táxons (dentre espécies e filotipos).

Neste mesmo trabalho, Aas *et al.* (2005) apresenta um total de 47 espécies ou filotipos presentes na microbiota subgengival dos cinco indivíduos com saúde periodontal (PS <3mm, sem sangramento). Do total de táxons foram encontradas com proporções acima de 15% dos clones obtidos as espécies *S. mitis* (3 indivíduos), *S. intermedius* (um indivíduo), *Gemella haemolysans* (2 indivíduos), *C. gracilis* (um indivíduo). Dos táxons que foram encontradas em valores menores que 15% em três indivíduos são: *Streptococcus* clone EK048/AF e *Gemella morbillorum*; e em dois indivíduos: *S. mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Granulicatella elegans*, *Granulicatella adiacens*, *Rothia dentocariosa*, *Peptostreptococcus* sp. CCUG 42977, *Veillonella* clone AA050 e *V. parvulla* ou *Veillonella dispar*. Dois novos filotipos foram identificados: *Leptotrichia* clone HE052 e *Propionibacter* clone HE018.

Em um estudo de Paster *et al.* (2001) foram selecionados 11 indivíduos com periodontite refratária (*sic*), nove com periodontite, quatro com gengivite ulcerativa necrosante, dois com periodontite e positivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), e, por fim, cinco indivíduos com saúde periodontal. A partir de três pares de iniciadores de PCR, um desenhado para a maioria das *eubacteria* (D88 e E94), outro para a maioria de *Spirochaetes* (D88 e C90) e outro para *Bacteroidetes* (D88 e F01) foram identificados ao todo 347 táxons bacterianos na microbiota subgengival de 2.522 clones. Baseando-se nos cálculos de estimativas de Boneh *et al.* (1998), citado neste mesmo artigo científico, foram calculados possíveis 68 outros táxons não observados (caso fossem analisados 10.000 clones). O que, segundo os autores, gerariam possíveis 415 táxons que potencialmente poderiam habitar o ambiente subgengival. Nesse trabalho foram identificados nove diferentes filós: *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Deferribacteres* (incluído o filo

Sinergistetes), TM7 e *Obsidian Pool* (OP11). Os dois últimos não possuem representantes cultivados, sendo que o filo OP11 apresenta apenas um clone oral e outros representantes geralmente são encontrados em amostras de sedimentos do fundo do mar e detritos industriais em esgotos. Do total de clones, 60% obtiveram 99% de similaridade com 132 espécies já conhecidas e 40% obtiveram similaridade de 99% com 215 *clusters*, determinados como filotipos.

Hutter *et al.* (2003) analisaram um total de 578 clones de amostras de um sítio periodontal (PS>5mm) de 26 indivíduos com periodontite e seis indivíduos periodontalmente saudáveis. Foram utilizados dois pares de iniciadores de PCR de posições 27F/519R e 515F/1525R e obtidos 148 filotipos para o primeiro e 75 filotipos para o segundo par. Trinta e quatro espécies foram identificadas e 15 associados a prováveis novos filotipos, sendo que uma sequência teve a análise de 1490 pb realizada e fora classificada como Periodontitis Clone 10B6 e associada à classe *Alpha-proteobacteria*, do qual fazem parte bactérias do gênero *Rickettsia*. Os autores não especificaram o total de filotipos distintos presentes nas duas bibliotecas clonais combinadas. O ponto de corte utilizado para diferenciação de táxons foi de 99% e para novos filotipos foi de similaridade <97% com o GenBank. Houve representantes dos filios *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Deferribacteres*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* e *Firmicutes*.

Com o uso de três pares de oligonucleotídeos iniciadores de Lillo *et al.* (2006) foram identificados e sequenciados para o gene 16SrDNA um total de 417 clones a partir de três amostras de dois indivíduos com periodontite crônica localizada. O ponto de corte utilizado para identificar uma UTO dentro de um táxon específico foi de 99% de similaridade com o GenBank. Não foi relatado o ponto de corte para novos filotipos. Os autores encontraram um total de 137 táxons, sendo 56 espécies já nomeadas, 43 filotipos já identificados e encontrados no banco de dados GenBank e 38 foram determinados como novos filotipos. Desta forma, 60% foram táxons não cultivados. Nove filios foram encontrados dentre as amostras, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria*, *Deferribacteres/Sinergistetes*, TM7, *Actinobacteria* e o filo *Chloroflexi*.

O grupo *Synergistetes* trata-se de um novo filo de bacilos longos e curvos, o qual inclui os gêneros *Aminobacterium*, *Aminomonas*, *Aminiphilus*, *Anaerobaculum*, *Cloacibacillus*, *Dethiosulfovibrio*, *Jonquetella*, *Pyraminobacter*, *Synergistes*, *Thermanaerovibrio* e *Thermovirga* (Vartoukian *et al.*, 2007). Este novo filo foi incluído erroneamente, segundo, Vartoukian *et al.* (2009), como do filo *Deferribacteres* em outros trabalhos. Este novo filo inclui dois grupos principais: grupo (*cluster*) B, dos quais fazem parte os dois únicos representantes já cultivados (Jumas-Bilak *et al.*, 2007; Downes *et al.*, 2009) do ambiente bucal (*Jonquetella anthropi* e *Pyramidobacter piscolens*) e o grupo (*cluster*) A, que comporta, até a data desta revisão, 20 táxons ainda não cultivados. O grupo A está dividido em alguns artigos por grupos de UTO's (OTU's) ou em sua apresentação tradicional por clone como no PubMed (National Library of Medicine, NCBI - National Center for Biotechnology Information, USA) e no HOMD (Human Oral Microbiome Database, The Forsyth Institute, Boston, MA, USA).

Diversos filotipos do filo *Synergistetes* foram associados com as doenças periodontais (Paster *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2005; Vartoukian *et al.*, 2009). Dentre estes filotipos associados às periodontites pode-se citar os grupos OTU 1 (clones BH017 e JV006), OTU 3.3 (BH007), OTU 4.1 (clone JV023), OTU 4.2 (clone A2F_22), OTU 6.1 (clone W028), OTU 6.2 (clone W090) e o clone D084.

Em uma das revisões mais extensas sobre a microbiota subgingival na literatura pesquisada (PubMed, acesso 2010 Apr 25), Moore & Moore (1994b), associado a outros trabalhos publicados pelo mesmo grupo (Moore *et al.*, 1982a; Moore *et al.*, 1982b; Moore *et al.*, 1983; Moore *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1987; Moore *et al.*, 1991), descreveram 509 espécies de bactérias de amostras do sulco gengival e bolsas periodontais a partir de aproximadamente 51.000 isolados bacterianos de 300 pacientes. Sendo 368 espécies encontradas pelo menos duas vezes. Diversos grupos foram incluídos: Gengite IG=0, Gengivite IG=1, Gengivite IG=2, Periodontite de Acometimento Precoce, Periodontite Moderada, Periodontite Juvenil Localizada, Periodontite do Adulto (leve a moderada). Todos os indivíduos do estudo apresentavam boa saúde sistêmica e não utilizaram antibióticos em um período de seis meses anteriores às coletas.

Ainda no mesmo trabalho de Moore & Moore (1994b), a partir dos meios de cultura utilizados, observou-se que as espécies mais comuns que ocorreram nas amostras de biofilme subgingival foram *A. naeslundii* e *F. nucleatum*, sendo as subespécies *vincentii*, *nucleatum* e *porlymorphum* identificadas em uma proporção de 7:3:2, respectivamente. Nos trabalhos associados à progressão da gengivite a espécie *F. nucleatum* demonstrou uma associação com a progressão da inflamação gengival (IG de 0 para 1). Com a progressão da inflamação (IG=2) outras espécies começaram a apresentar crescimento estatisticamente significativo (valor $p < 0,005$) em relação aos outros estádios da inflamação (*S. sputigena*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *C. concisus*, *Eubacterium alactolyticum*, *Lactobacillus uli*, *Eubacterium saphenum*, *Filifactor (Fusobacterium) alocis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella denticola*, *S. infelix*). Outras espécies também obtiveram crescimento significativo, porém estatisticamente menos representativos (valor p entre 0,01 e 0,05) que os anteriores (*Bifidubacterium dentium*, *P. gingivalis*, *Fusobacterium sulci*, *Eubacterium D33*, *Centipeda periodontii* e *E. nodatum*). Outras espécies como alguns *Spyrochaetes* foram observados por cultura e por microscopia. Ouve um aumento na contagem de treponemas de IG=0 para IG=1 e IG=2, apesar de não haver validação para que estes sejam particularmente relacionados à progressão da doença, provavelmente devido às dificuldades no cultivo destes micro-organismos. As espécies encontradas foram *T. denticola*, *T. pectinovorum*, *Treponema S04*, *T. vincentii*, *Treponema socranskii* subespécies *buccale*, *paredis* e *socranskii*, além de um longo treponema que somente foi observado por microscopia e não encontrado por cultura. Um representante de *Mycoplasma* também foi observado. Foram encontrados *A. actinomycetemcomitans* em baixas proporções em relação a outros micro-organismos. Os autores discutem algumas espécies como de importância para as periodontites, inclusive devido às suas correlações a infecções extra-buciais causadas por um único micro-organismo e isolados pelo grupo: *Dialistes pneumosintes*, *E. alactolyticum*, *P. denticola*, *S. infelix*, *C. periodontii*, além dos treponemas e micoplasma.

Os mesmos autores (Moore & Moore, 1994a), publicaram no International Journal of Systematic Bacteriology a identificação de quatro novas espécies orais associadas à gengivite e/ou periodontite: *Oribaculum catoniae* (ATCC 51270);

Catonella morbi (ATCC 51271); *Hallella seregens* (ATCC 51272); e *Johnsonella ignava* (ATCC 51276). Foi encontrada também *Dialister pneumosintes*, porém os autores acreditam que esta acomoda as espécies denominadas *Bacteroides pneumosintes* relatadas anteriormente por outros autores em 1921.

Técnicas de Biologia Molecular no Auxílio do Estudo da Diversidade Microbiana

Apesar de bastante valiosas na identificação de espécies, técnicas baseadas em cultura de bactérias possuem algumas limitações em suas identificações devido a uma alta seletividade de micro-organismos, além do tempo de cultivo elevado para algumas espécies, ou mesmo, impossibilidade de cultivo, espaço físico, considerável, necessário para análise de grandes números de indivíduos e espécies (Armitage, 2010; Paster et al., 2006; Papapanou, 2002). Considerando-se a estimativa de que até entre 50-60% das bactérias presentes nas mucosas bucais e biofilmes dentais foram cultivadas até o presente momento (Armitage, 2010) e a partir dos trabalhos anteriormente apresentados sobre a diversidade e complexidade microbiana bucal e, em especial, a microbiota subgingival, observa-se a necessidade de técnicas de identificação independentes de cultivo para complementar o conhecimento sobre esta microbiota.

As técnicas biomoleculares, apesar de suas limitações, possuem a vantagem em detectar espécies de difícil cultivo (i.e. espiroquetas, anaeróbios estritos, *etc.*) ou que ainda não são cultiváveis. O principal modelo biomolecular para pesquisa da diversidade microbiana consiste na amplificação do gene do 16S rRNA (16SrDNA), clonagem dos amplicons em *Escherichia coli* e sequenciamento das inserções clonadas (Cohen *et al.*, 1972). Além disso, uma técnica relativamente recente foi desenvolvida para a análise e comparação de perfis microbianos. Esta técnica, baseada em PCR, *nested*-PCR com um oligonucleotídeo iniciador modificado e após a deposição das amostras do produto de *nested*-PCR em um gel especial de poliacrilamida, é conhecida como Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e tem demonstrado um grande potencial para estudos qualitativos e comparativos da constituição microbiana em nichos da cavidade oral. Ambas as técnicas foram utilizadas neste trabalho.

DGGE – Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação

A técnica de DGGE, inicialmente, teve sua teoria descrita por Fischer & Lerman em 1979 (Fischer & Lerman, 1979) e fora, a princípio, utilizada para a análise de mutações ou detecção de polimorfismo gênico. Esta técnica baseia-se na separação de fragmentos de DNA de tamanho molecular semelhante (pares de base nitrogenadas - pb), porém sequências diferentes, por meio da corrida dos *amplicons* em gel de poliacrilamida com proporções graduais e crescentes de solventes de desnaturação (formamida e uréia) a uma temperatura constante (60°C).

Quando um fragmento de DNA é submetido a um aumento das condições de desnaturação promovidas por uma temperatura constante (60°C), por um gradiente linear crescente de concentração de formamida (0-40%) e uréia (0-7M), ele se desnatura parcialmente (Fischer & Lerman, 1979; Fischer & Lerman, 1983). Esta separação da dupla fita da sequência de DNA ocorre nos chamados domínios de desnaturação (*melting domains*), os quais são trechos de pares de base com qualidades de desnaturação semelhantes. A abertura de trechos da dupla fita causa uma diminuição na taxa de mobilidade do fragmento de DNA, por consequência da mudança de conformação (Fischer & Lerman, 1983; Muyzer & Smalla, 1998). Fragmentos de DNA de fita dupla movem-se através do gel de forma constante, determinada por seu peso molecular, até que encontram uma concentração desnaturante em que a dupla-fita de DNA começa a se separar. Fragmentos desnaturados formam ramificações e, assim, possuem mobilidade baixa quando comparada à mobilidade da forma helicoidal da molécula. Desta forma, a posição final de um fragmento de DNA no gel é determinada por seu padrão de desnaturação. A substituição de uma única base altera a desnaturação de uma porção da molécula de DNA de forma suficiente para causar uma separação (Fischer & Lerman, 1983).

Com o objetivo de melhorar a resolução do gel e aumentar o número de substituições de bases que podem ser detectadas, um domínio CG de alto coeficiente de desnaturação deve ser acrescentado artificialmente à molécula de DNA durante a amplificação de PCR. Isto é feito pela utilização de um iniciador contendo uma extremidade 5' formada por uma sequência de GC-40 (Myers *et al.*, 1985a; Myers *et al.*, 1985b). A análise por DGGE apresenta como vantagem à técnica de amplificação do

gene 16SrDNA e clonagem a seleção de espécies representativas a observação de apenas espécies com no mínimo 1% de representação, menor custo, e possibilidade de análise de uma quantidade maior de amostras de uma só vez (Muyzer & Smalla, 1998).

Esta técnica de PCR-DGGE tem se revelado de grande auxílio na detecção de espécies cultivadas e ainda não cultivadas em comunidades de diversos ambientes de bactérias de difícil cultivo. A DGGE tem sido amplamente utilizada na análise da diversidade microbiana de *habitats* naturais simples como alimentos (Florez & Mayo, 2006) até mesmo ambientes complexos como solo simplesmente, ou rizosferas de plantas (Gelsomino *et al.*, 1999; Ibekwe *et al.*, 2001; Duineveld *et al.*, 2001), áreas costeiras ou biofilmes em superfícies marinhas (Kowalchuk *et al.*, 1997; Webster & Negri, 2006), entre outros diversos *habitats*.

Na área da saúde, como na Medicina, o PCR-DGGE tem se revelado de ótima utilidade para análise de grandes quantidades de amostras de infecções polimicrobianas ou comunidades complexas em seres humanos (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2004; Bibiloni *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2007). Uma equipe de pesquisadores empregou a técnica para avaliar a microbiota associada a tecidos oculares hígidos ou ulcerados (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2002). A diversidade genética de bactérias fecais (Satokari *et al.*, 2001) e de bactérias associadas à mucosa intestinal (Green *et al.*, 2006), também, foram analisadas pela técnica de DGGE, assim como a microbiota vaginal de mulheres no período pós-menopausa (Burton & Reid, 2002) e pacientes com vaginite recorrente (Devillard *et al.*, 2005).

No campo da Odontologia, tal técnica tem se mostrado como mais um forte auxílio no intuito de auxiliar na compreensão de comunidades complexas no ambiente bucal (Zijngel *et al.*, 2003; Rôças *et al.*, 2004; Rôças *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Alguns estudos em especial utilizaram a PCR-DGGE para estudar o biofilme subgengival, cuja alteração pode promover a periodontite.

Estudos da Microbiota Subgengival por Meio de PCR-DGGE

Em 2003, Fujimoto *et al.* apresentaram um dos primeiros trabalhos no intuito de verificar a possibilidade de análise do perfil microbiano de 11 amostras de biofilme subgengival de quatro indivíduos (três portadores de periodontite do adulto e um de

periodontite juvenil [*sic*) por meio de PCR-DGGE. Foram observados padrões de bandas distintos para indivíduos diferentes e padrões semelhantes para algumas amostras de um mesmo indivíduo e sítios periodontais rasos demonstraram um padrão de bandas menos complexo que em bolsas moderadas a profundas.

Em trabalho apresentado por Zjinge *et al.* (2003) com 15 indivíduos, nove portadores de periodontite e seis familiares saudáveis, foram observadas bandas intensas que representavam *Exiguobacterium auranticum* em 13 de 25 amostras, o que indicaria uma possível importância na periodontite. Foram observadas uma predominância de bandas representativas de *F. alocis* e uma provável espécie do gênero *Eubacterium*.

Em trabalho publicado em 2007, Ledder *et al.* compararam o perfil microbiano por meio de DGGE de 29 indivíduos com periodontite crônica (PC) e 18 indivíduos periodontalmente saudáveis (SP). O padrão de banda de cada paciente na maioria das raiais obteve níveis de similaridade entre 20 e 50% sendo o maior índice de similaridade com 70% (ocorrido entre uma amostra de PC e SP) e mínimas de até 10% de acordo com a análise de *cluster* por UPGMA. Houve uma tendência para a formação de grupos entre doença e saúde periodontal, porém esta não ficou completamente delineada.

3 - PROPOSIÇÃO

O presente trabalho possui como objetivos:

- Avaliar e comparar, por meio da técnica de eletroforese por gel de gradiente desnaturante (DGGE), o perfil genético de comunidades microbianas associadas a bolsas periodontais moderadas (de 5 a 6 mm) e sítios periodontais com bolsas de profundidade de sondagem ≥ 7 mm.

- Realizar a análise clonal do gene 16SrDNA e a comparação da microbiota de indivíduos portadores de periodontite crônica ou agressiva generalizadas dos sítios periodontais com bolsas de profundidade de sondagem ≥ 7 mm.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

PROCEDIMENTOS CLÍNICOS REALIZADOS

Seleção e coleta de amostras de biofilme subgengival

Como critério para periodontite crônica generalizada foram selecionados 16 indivíduos com no mínimo 20 dentes naturais, portadores de pelo menos oito dentes não contíguos com pelo menos um sítio com profundidade de sondagem ≥ 5 mm, com sangramento à sondagem e perda óssea radiográfica. Foram também selecionados 17 indivíduos com periodontite agressiva generalizada, baseando-se nos seguintes critérios: máximo de 35 anos de idade, presença de pelo menos oito dentes com pelo menos um sítio com profundidade de sondagem ≥ 5 mm, sangramento à sondagem e perda óssea radiográfica, sendo pelo menos três dentes permanentes não contíguos diferentes dos primeiros molares e incisivos. Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, acima de 18 anos, sistemicamente saudáveis, não-tabagistas, não portadores de próteses dentárias extensas, mulheres não-gestantes/lactantes e sem histórico de terapia antimicrobiana e/ou terapia periodontal nos últimos seis meses anteriores à coleta.

Foram selecionados em cada indivíduo um sítio com profundidade de sondagem (PS) de 5 a 6 mm (bolsa moderada) e outro acima de 7 mm (bolsa profunda). No momento da coleta, foi feito o isolamento relativo dos locais e a placa supragengival foi cuidadosamente removida com o auxílio de uma gaze para evitar contaminação da amostra subgengival. Em seguida, dois cones de papel absorvente foram inseridos por trinta segundos no sítio periodontal para obtenção da placa subgengival. Os cones foram transferidos imediatamente para tubos de microcentrifugação contendo 300 μ L de tampão TE (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e transportados para o laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp. Em seguida, cada tubo contendo os cones de papel foi agitado em aparelho de vórtex por um minuto. As amostras foram congeladas a -20°C para posterior extração de DNA.

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS REALIZADOS

Purificação de DNA das amostras

A purificação de DNA das amostras clínicas obtidas de bolsas periodontais (66 amostras iniciais) foi realizada segundo protocolo adaptado de Smith *et al.* (1989) e previamente utilizado pelo laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp (Saito *et al.*, 2006; del Peloso Ribeiro *et al.*, 2008; da Cruz *et al.*, 2008). As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por dez minutos e, então, agitadas por 30 segundos em aparelho de vórtex. Em seguida, os cones de papel foram removidos dos tubos de microcentrifugação. As células bacterianas foram precipitadas por centrifugação a 20.000g, por dez minutos, e o sobrenadante, descartado. Para a extração de DNA de cada amostra foi preparada uma solução tampão para extração contendo: 0,2 mL de CTAB (brometo N-Cetil-N, N, N-trimetil-amonio, p.a., Sigma); 373 µL de água ultrapura deionizada (MilliQ, Millipore); 100 µL de Tris-HCl 1 M, pH 8,0; 280 µL de NaCl 5M; 40 µL de EDTA 500 mM, pH 8,0; 2 µL de β-mercaptanol p.a.

Foram adicionados 700 µL de tampão de extração em cada frasco e acrescido 5 µL de proteinase K (Invitrogen) de 20 mg/mL nesta primeira etapa. Os frascos, então, foram agitados em aparelho de vórtex e mantidos em banho-maria a 65°C durante 30 minutos. Após essa fase, foi adicionado, a cada frasco, 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (CIA) e foi realizada centrifugação a 12.000 rpm, durante sete minutos. A fase aquosa foi depositada em novo tubo de microcentrifugação e adicionou-se 200 µL da solução tampão e 650 µL de CIA. A mistura foi centrifugada (12.000 rpm), durante sete minutos. A fase aquosa foi transferida, novamente, para outro tubo de 1,5 mL e adicionado 650 µL de CIA. Em seguida à centrifugação (12.000 rpm, 7 minutos), a fase aquosa foi transferida para um tubo e acrescentou-se 700 µL de isopropanol. Os tubos foram, então, mantidos sobre refrigeração a -20°C, durante 60 minutos para precipitação do DNA e, depois, centrifugados (12.000 rpm, sete minutos), para formação de precipitado. A solução sobrenadante foi descartada e o precipitado lavado, duas vezes, com etanol 70% (12.000 rpm, dois minutos), e, após evaporação da solução alcoólica, ressuspensas em 40 µL de solução TE contendo 0,5 µL de RNase 10 µg/mL e mantidas em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

Cada amostra foi analisada por espectrofotometria (GeneQuantTM 1300 – General Electric Healthcare) para aferição da concentração de DNA genômico (densidade óptica de 50 nm) para padronização da concentração da reação de PCR. As amostras de DNA foram mantidas em refrigeradores a -20°C até avaliação. Logo após, as amostras foram testadas com os oligonucleotídeos iniciadores universais descritos em Paster *et al.*, 2001 por meio de PCR convencional. Algumas amostras se apresentaram negativas, estas foram testadas novamente e no caso de confirmação da ausência de qualquer imagem de banda, eram excluídas.

Padronização dos oligonucleotídeos iniciadores para 16SrDNA para PCR convencional

Foram selecionados, a partir da literatura, os iniciadores de PCR: direto D88 e reverso E94 (Paster *et al.*, 2001) (tabela 1). A reação original foi testada para a cepa *Streptococcus mutans* UA159 (figura 01). Esta foi constituída de desnaturação inicial a 95° por oito minutos, seguida de 30 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 45s, anelamento a 60°C por 45s, extensão a 72°C por 1,5 minuto adicionado de 5 segundos para cada ciclo e extensão final de 72°C por 10 minutos. Foram utilizadas as concentrações de DNA molde de 5 ng, 10 ng, 15 ng e 20 ng. A reação inicial foi modificada e adaptada para as condições deste trabalho. As condições utilizadas, por fim, para a PCR das amostras clínicas foram constituídas de desnaturação inicial 95°C por 5 minutos, seguido de 20 ciclos com as seguintes temperaturas e tempos: desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento de 60°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 100 segundos e, por fim, extensão final a 72°C por 30 minutos. As seguintes concentrações foram adaptadas para cada reação de 25 µL: H₂O milli-Q – 18,625 µL; Tampão PCR 10X - 2,5 µL; dNTP 10 mM – 0,5 µL; MgCl₂ 50 mM – 1,25 µL; Primer direto 10 µM– 0,5 µL; Primer reverso 10 µM – 0,5 µL; TAQ DNA polimerase 5U/µL (0,125 µL), DNA - 1 µL (figuras 02, 03, 04, 05). O número de ciclos fora reduzido para 20, dos originais 30 descritos em Paster *et al.* (2001), para diminuição de produtos quiméricos ou inespecíficos durante a reação de *nested*-PCR (figuras 02, 03, 04 e 05).

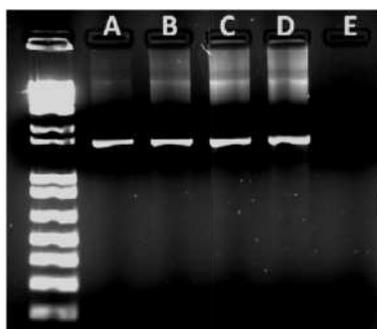


Figura 01. Concentração de DNA (*S. mutans* UA159): A-5 ng/ μ L; B -10 ng/ μ L; C -15 ng/ μ L; D -20 ng/ μ L; E-controle negativo.

Padronização das Reações de Nested-PCR

Para as amostras de periodontite crônica e periodontite agressiva foram utilizados os iniciadores de PCR descritos por Zijngé *et al.* (2003) (tabela 02). Sendo que, para ambas, a fase de extensão final fora adaptada, para 30 minutos, para diminuir a formação de bandas secundárias de acordo com Janse *et al.* (2004).

Tabela 01. Oligonucleotídeos iniciadores de PCR para o gene 16SrDNA, segundo Paster *et al.* (2001).

Primer	Sequência nucleotídica
D88 - direto	5'- GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG-3'
E94 - reverso	5'- GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA-3'

Tabela 02. Oligonucleotídeos iniciadores para a reação de *nested*-PCR segundo Zijngé *et al.* (2003).

Primer	Sequência nucleotídica
F968	5'-CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
R1401	5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'

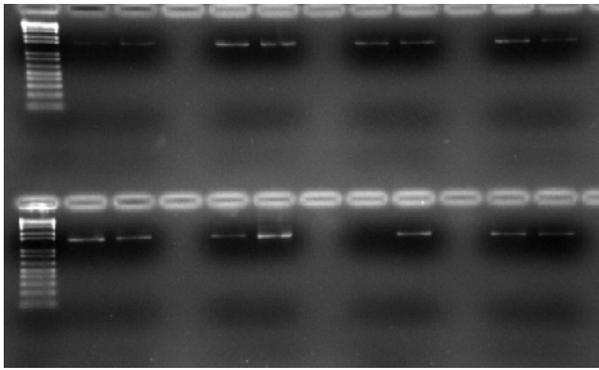


Figura 02. Pares de amostras de periodontite crônica testados para 16S – parte 1

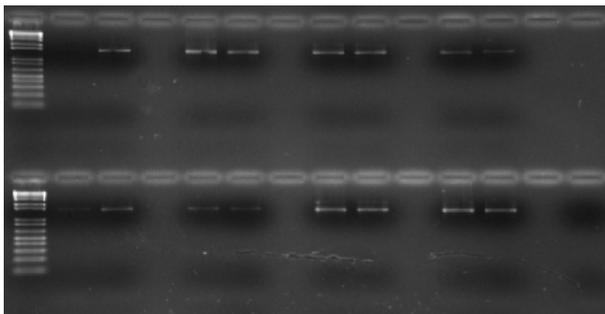


Figura 03. Pares de amostras de periodontite crônica testados para 16S – parte 2

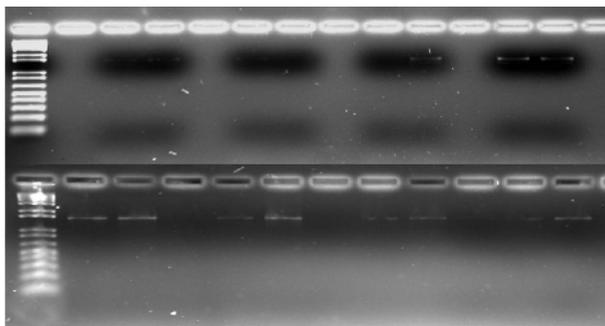


Figura 04. Pares de amostras de periodontite agressiva testados para 16S – parte 1

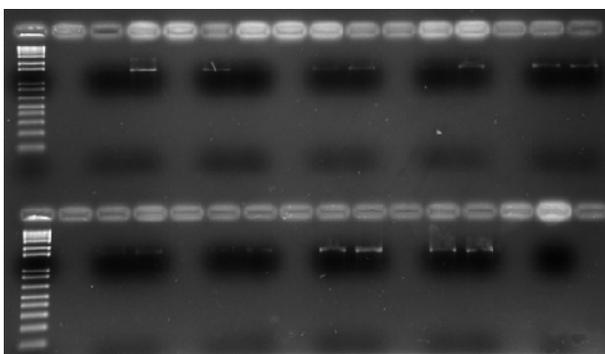


Figura 05. Pares de amostras de periodontite agressiva testados para 16S – parte 2

Nested-PCR das Amostras de Periodontites Crônica e Agressiva para DGGE

Foi realizada a reação de *nested-PCR* (figuras 06 e 07) de alguns dos pares (BM e BP) da primeira reação (15 de PCG e 14 de PAG) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos compostos por uma desnaturação inicial de 94°C por 45 segundos, uma fase de anelamento a 49°C por 30 segundos e uma fase de extensão a 72°C por um minuto e, por fim, uma fase de extensão final durante 30 minutos. Um dos pares de amostras (PC01) de indivíduos de PCG fora mantido apesar de não possuir amostra de BM (sem DNA suficiente para novas reações), pois fora utilizado no trabalho de análise clonal (figura 06).

Foram preparadas reações de 50 µL com as seguintes concentrações de reagentes: H₂O milli-Q – 38,25 µL; Tampão PCR 10X - 5 µL; dNTP 10 mM – 1,0 µL; MgCl₂ 50 mM – 2,5 µL; *Primer* direto 10 µM – 1,0 µL; *Primer* reverso 10 µM – 1,0 µL; TAQ DNA polimerase 5U/µL, produto da PCR do gene 16SrDNA - 1 µL. Dois padrões negativos destas reações (sem DNA) e mais uma reação contendo 1 µL do produto proveniente do controle negativo da primeira reação para 16SrDNA também foram testadas para confirmação de ausência de contaminação e produtos inespecíficos.

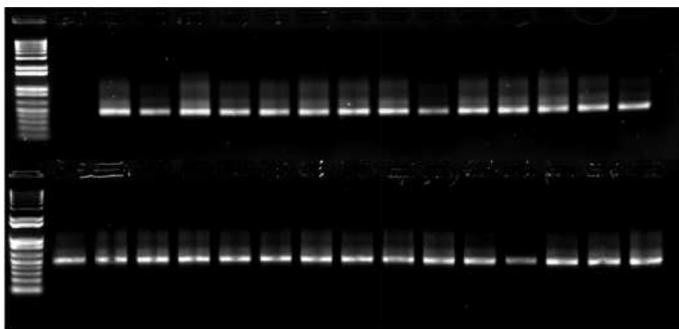


Figura 06. Nested PCR amostras periodontite crônica.

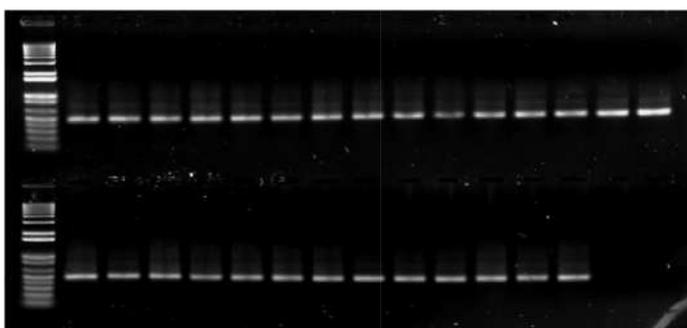


Figura 07. Nested PCR das amostras de periodontite agressiva.

Preparo das soluções do gel de gradiente de desnaturação

Os géis de poliacrilamida com gradiente de desnaturação foram preparados de acordo com as recomendações no manual do sistema PhorU2 (Ingeny, Leiden, The Netherlands) no CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura / Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP). Detalhadamente, foram preparadas duas soluções-estoque a 8% bis-acrilamida, uma a 100% de desnaturação (40% bis/acrilamida - 1: 37,5 – 20 mL, 50X tampão TAE – 2 mL, Formamida deionizada – 40 mL, Uréia – 42 g, água Milli-Q para 100 mL) e outra a 0% de desnaturação (40% bis/acrilamida - 1: 37,5– 20 mL, 50X tampão TAE – 2 mL, água Milli-Q – 78 mL). As duas soluções-estoque foram preparadas e misturadas de modo a obter 25 mL de uma solução com coeficiente de 40% de desnaturação e 25 mL de outra solução com coeficiente de 60% de desnaturação. Para a polimerização do gel foi adicionado 75,0 µL de persulfato de amônio 0,2 g/mL e 12,0 µL de TMED (Navarrete, 2009).

Preparo dos géis de poliacrilamida

O gel não-polimerizado foi depositado entre duas placas de vidro com auxílio do aparato de distribuição de gradiente e posicionado um pente entre as placas para a produção de 36 canaletas para deposição das amostras. A polimerização ocorreu em no mínimo uma hora. O aparato foi montado devidamente de acordo com o manual do fabricante. Os géis foram depositados no tanque de eletroforese e o módulo de controle de temperatura e eletroforese ajustado para 60°C (Navarrete, 2009).

Preparo das amostras de periodontite crônica e agressiva para DGGE

Quinze pares de amostras (bolsa moderada e bolsa profunda) de paciente do grupo PCG e 14 do grupo PAG foram selecionados pela presença de banda na reação de *nested*-PCR. Foram preparadas soluções individuais de 8,0 µL do produto do *nested*-PCR mais 2,0 µL de tampão corante (0,05% azul de bromofenol, 0,05% xileno-cianol, 70% glicerol e 29,9% água MilliQ) para cada canaleta. As primeiras e últimas canaletas dos géis (1^a e 36^a) foram evitadas devido à alta chance de grande deformação das bandas nestas áreas (*smiling effect*). Nas demais canaletas, as bandas raramente sofriram deformações e quando estas ocorriam, demonstraram-se passíveis de fácil correção e/ou normalização no programa BioNumerics® 6.0. As segundas e penúltimas canaletas,

bem como uma canaleta posicionada no meio do gel, foram preenchidas com 1,0 µL de solução 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) contendo aproximadamente 1000 ng de fragmentos de bases nitrogenadas entre 100 e 1500 pares de base (pb), mais um fragmento de 2072 pb. Este padrão foi utilizado para a normalização das bandas (Navarrete, 2009).

Eletroforese do gel com gradiente de desnaturação

O módulo de controle de temperatura e eletroforese foi ligado a uma fonte de eletroforese com estabilizador de voltagem. A fonte foi ajustada para 96V por 16 horas.

Coloração e fotodocumentação dos géis

Os géis foram corados com nitrato de prata 0,2% de acordo com protocolo em Sanguinetti *et al.* (1994) e documentados digitalmente com auxílio de um aparelho digitalizador de imagens (*scanner*) de transiluminescência ImageScanner II (Amersham – GE HealthCare). Detalhadamente, os géis foram marcados para identificação e cuidadosamente removidos das placas de vidro para um vasilhame contendo solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,5% e água MilliQ q.s.p. 300 mL) durante 5 minutos, sob agitação suave. A solução fixadora foi reservada em frasco de vidro e o gel foi transferido para uma solução contendo 0,2% de nitrato de prata (300 mL) e mantido sob agitação suave por 10 minutos, logo após, o gel foi lavado rapidamente em água Milli-Q. A solução de prata foi drenada e acrescentou-se ao vasilhame solução reveladora (NaOH 3%, Formaldeído 3%, água MilliQ q.s.p. 300 mL). O vasilhame foi mantido sob agitação por 10 minutos, em seguida, a solução reveladora foi drenada e acrescentou-se a solução fixadora novamente. Para a fotodocumentação os géis foram cuidadosamente posicionados em um digitalizador de imagens de transiluminescência (ImageScanner PowerLook 1120 – Amersham – GE HealthCare) para digitalização em arquivo formato (extensão) TIFF (*tagged image file format*).

Normalização das bandas da imagem digitalizada

A manipulação das imagens foi realizada com auxílio do programa BioNumerics® 6.0 (AppliedMaths). A normalização das bandas foi realizada utilizando-se como padrão as bandas presentes nas extremidades e no meio dos géis a partir de um padrão Ladder de 100 pb (Invitrogen).

Leitura das bandas e contagem

Após a normalização, as bandas foram marcadas no programa BioNumerics® 6.0. O reconhecimento das bandas foi feito manualmente por um único pesquisador treinado, no caso de dúvida foi utilizado auxílio de detecção de picos de *pixels* e detecção de bandas do próprio programa após eliminação de ruídos. A contagem total das bandas de cada coluna/amostra foi realizada e feita análise estatística por meio de teste de Mann-Whitney-Wilcoxon (Teste U de Mann-Whitney) para avaliação de diferenças no perfil de bandas entre os grupos e Wilcoxon-pareado dentro dos grupos.

Dendrograma e similaridade

A similaridade do padrão de bandas intra-gel foi verificada utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard e a análise de cluster dos algoritmos para a produção do dendrograma foi feita a partir da matriz de distâncias utilizando o método da média aritmética de pares de grupos não-pesados (UPGMA) (Michener & Sokal, 1957).

Clonagem do gene 16SrDNA das amostras de periodontite crônica e agressiva

Foram selecionadas 10 amostras de cada grupo (PAG e PCG) das amostras de biofilme subgingival de bolsas profundas ($PS \geq 7\text{mm}$) e 10 ng do DNA purificado de cada amostra de biofilme foi utilizada como molde para a reação de PCR. Foram inicialmente preparadas cinco reações de 25 μL para cada amostra de biofilme de bolsa profunda com os oligonucleotídeos iniciadores 27F e 1492R (de Lillo *et al.*, 2006) (Tabela 04). As cinco reações foram misturadas para um total de 125 μL e purificadas com o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) conforme recomendações do fabricante. A PCR foi realizada com 20 ciclos compostos por uma fase de desnaturação de 94°C por 60 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão por dois minutos a 72°C, após os ciclos uma fase de extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos.

Tabela 03. Oligonucleotídeos iniciadores de PCR segundo de Lillo *et al* (2006)

Primer	Sequência nucleotídica
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'
R1492	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3'

Clonagem dos fragmentos de PCR amplificados

Um volume de 4 µL do amplicon purificado de cada amostra foi adicionado para reação com vetor (TOPO TA Vector – Invitrogen) e realizada a transformação em células quimiocompetentes (OneShot TOP 10 Competent Cells – Invitrogen). As amostras foram plaqueadas em meio LB com ampicilina (50 mg/mL, 1mg/mL) e 80 µL de X-Gal (20mg/mL dimetilformamida) a 37°C e, após 14 horas, foram selecionadas 60 colônias brancas, em média, por paciente. Cada colônia foi cultivada em meio caldo LB com ampicilina por 12 horas a 37°C.

Os plasmídios foram recuperados usando o QIAprep Spin Miniprep System (Qiagen) segundo instruções do fabricante. Em tubo de microcentrífuga, 1,5 mL de inóculo em meio LB com ampicilina (100 mg/mL) foram centrifugados por 3 minutos a 8000 rpm a 15 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado de bactérias foi suspenso em 250 µL de tampão P1 e, em seguida, foram adicionados 250 µL de tampão P2. O tubo foi invertido cuidadosamente para misturar. Foram adicionados, então, 350 µL de tampão PE e centrifugada por 60 segundos. O DNA foi eluído pela adição de 50 µL de tampão 10 mM Tris·Cl, pH 8.5 fornecido no kit, seguida de incubação por um minuto e centrifugação por um minuto. A concentração do plasmídeo foi estimada por espectrofotometria e então enviada para sequenciamento a uma concentração de 50 ng/µL (10 µL) (Saito *et al.*, 2006).

Sequenciamento parcial do gene 16SrDNA

Foram utilizados os iniciadores M13 direto e M13 reverso. O serviço de sequenciamento foi realizado pelo Centre de Recherche du CHUL (CHUQ, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Ville de Québec, QC, Canadá).

Análise da sequência do gene 16SrDNA

As sequências foram analisadas automaticamente em um Genetic Analyser ABI 3730xl (Applied Biosystems – Hitachi). As sequências de 600 bases foram visualizadas e ajustadas no sentido *sense* de leitura no programa BioEdit 7.0 (Hall, 1999), alinhadas por meio do algoritmo MUSCLE 3.6. (Edgard, 2004). A matriz de distância entre as sequências foi calculada com o auxílio do programa PHYLIP 3.69 com o algoritmo DNAdist (Felsenstein, 1989). As sequências foram agrupadas em *clusters* (táxons) de

acordo com uma similaridade mínima de 97%, a partir do cálculo da matriz de distâncias, utilizando-se o programa DOTUR 1.53 (Schloss & Handelsman, 2005). Um representante de cada filotipo foi selecionado e submetido ao programa BLAST dos sítios eletrônicos HOMD (<http://www.homd.org> – The Forsyth Institute) e GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - National Institutes of Health). Apenas os resultados com pontuação $\geq 97\%$ foram considerados para a identificação de táxons. Os táxons com identidade BLAST $< 97\%$ foram considerados como representantes de possíveis novos filotipos.

5 - RESULTADOS

Análise estatística do número de bandas dos géis

A análise bicaudal entre as médias aritméticas do número de bandas, consideradas aqui como unidades taxonômicas operacionais (UTO's) foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon (teste U de Mann-Whitney) para as amostras não-pareadas e Wilcoxon para as amostras pareadas (*i.e.*, comparações entre bolsas profundas e moderadas dos mesmos pacientes, dentro de um mesmo grupo de doença periodontal). Um valor-P (*p*) abaixo de 5% foi considerado como estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$).

Análise do DGGE

Foram observados um total de 352 bandas visíveis e/ou detectáveis pelo programa Bionumerics ® 6.0 para bolsas moderadas, 400 para bolsas profundas de periodontite crônica; e, 386 bandas para o gel de periodontite agressiva de bolsas moderadas, e, por fim, um total de 359 bandas para bolsas profundas (tabela 04).

Tabela 04 – Contagem de bandas representativas de OTU's para os indivíduos de cada grupo

Paciente	PC-BM	PC-BP	Paciente	PA-BM	PA-BP
PC01	-	26	PA01	23	30
PC02	16	28	PA02	27	21
PC03	24	36	PA03	25	29
PC04	30	26	PA04	29	25
PC05	23	29	PA05	29	27
PC06	23	23	PA06	34	27
PC07	26	24	PA07	27	28
PC08	27	29	PA08	27	27
PC09	29	28	PA09	30	24
PC10	29	28	PA10	30	24
PC11	27	35	PA11	31	23
PC12	31	23	PA12	21	18
PC13	30	25	PA13	29	30
PC14	18	20	PA14	24	26
PC15	19	20	-	-	-
TOTAL PC	352	400	TOTAL PA	386	359
M - PC	25,14a	26,66a	M-PA	27,57a	25,64a
σ - PC	$\pm 4,81$	$\pm 4,62$	σ - PA	$\pm 3,45$	$\pm 3,43$

M - Média aritmética; σ - Desvio-padrão

As médias de bandas representativas de UTO's para o grupo PCG e para as contagens de BM e BP foram de $25,14 \pm 4,81$ e $26,66 \pm 4,62$. E para o grupo PAG, esses valores foram, respectivamente, de $25,57 \pm 3,45$ e $25,64 \pm 3,43$. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos de PCG e PAG com relação às bolsas moderadas e profundas valor- $p=0,24$ e valor- $p=0,77$, respectivamente. Dentro dos grupos, as médias de UTO's não apresentaram diferença estatística quando comparadas entre BM e BP, tanto para PCG (valor- $p=0,12$), como para PAG (valor- $p=0,14$).

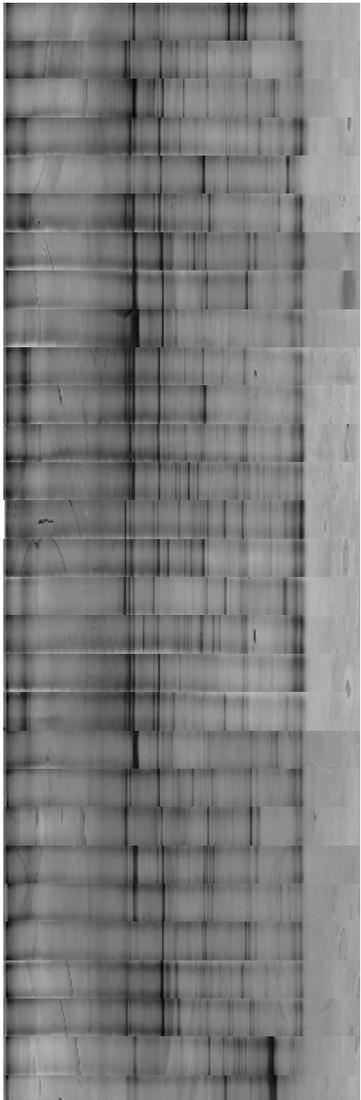
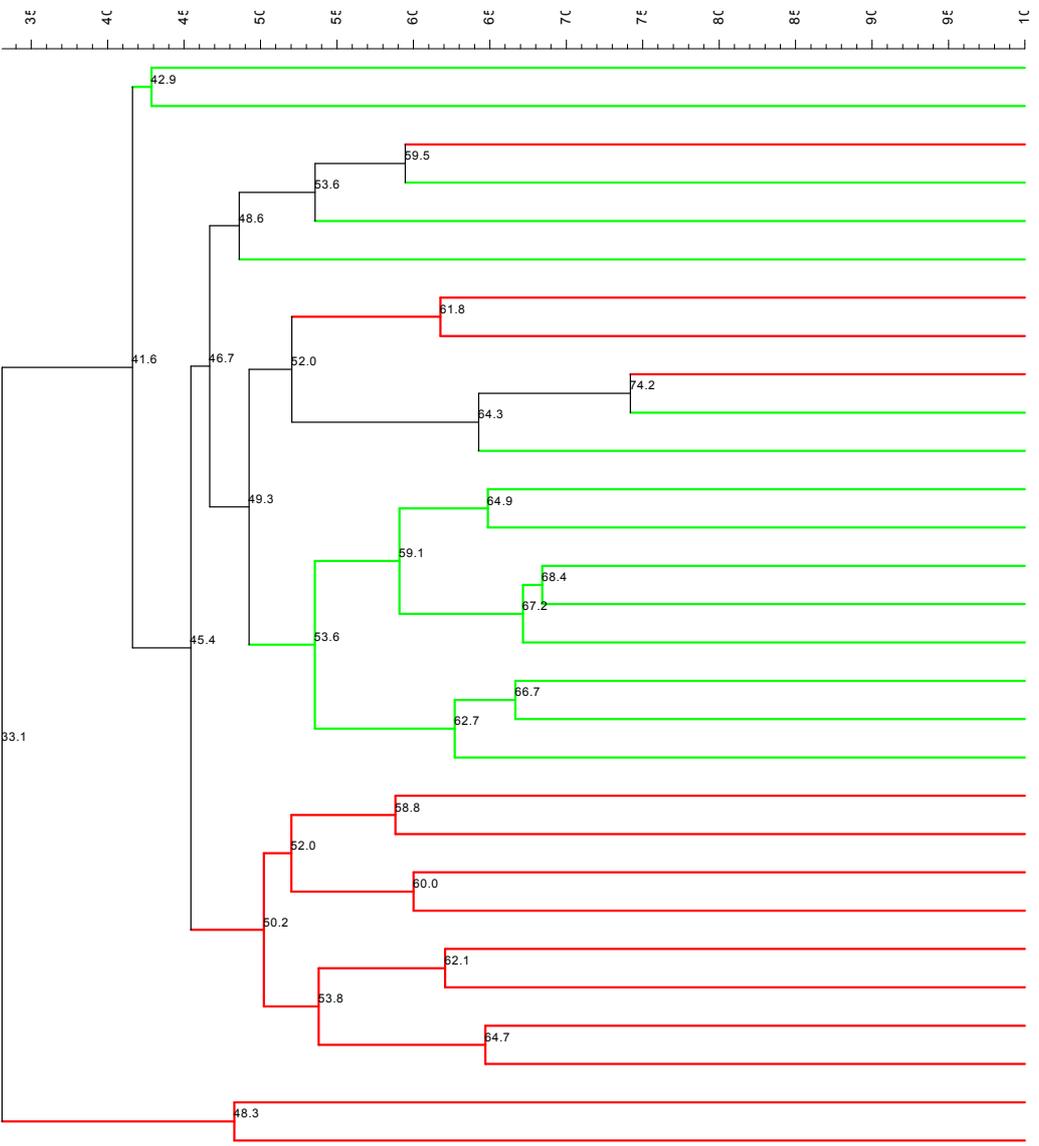
Construção de dendrogramas de similaridade intergrupo dos perfis de UTO's das amostras

A análise de similaridade foi feita a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard, um dendrograma para cada grupo foi construído a partir de algoritmos UPGMA (figuras 08 e 09).

As amostras de BM (figura 08) apresentaram valor mínimo de 31,0% de similaridade e máximo de 73,3%. Não houve tendência de formação de *clusters* entre os indivíduos dos grupos PCG e PAG. As maiores semelhanças entre os perfis de OTU's ocorreram entre os indivíduos PC05-BM e PC10-BM (73,3%), seguido de PA06-BM e PA10-BM (73,0%). Os valores apresentaram-se em uma faixa média de 50,3-59,2% de semelhança.

As amostras de BP (figura 09) apresentaram valores semelhantes aos de BM. Não houve diferença estatística entre os valores de semelhança de BP e BM (valor- $p=0,37$). O valor mínimo para BP de similaridade foi de 33,1% e máximo de 74,2%. As similaridades entre os indivíduos dos grupos para BP apresentaram-se em uma faixa média de valores de 52,1-60,0%. Os maiores valores de similaridade ocorreram entre os indivíduos de dois grupos diferentes PA14-BP e PC09-BP, seguidos de PC02 e PC03. Houve uma tendência à formação de dois *clusters* de oito amostras de cada grupo. No grupo PCG houve a formação de um *cluster* (PC01, PC11, PC02, PC05, PC04, PC07 e PC06) com similaridade mínima entre eles de 53,6% sem interposição de representantes do grupo PAG.

Figura 09. Dendrograma e percentual de similaridade entre os perfis de bandas de cada amostra de bolsa profunda dos grupos PCG e PAG.



- PC14-
- PC15-
- PA01-
- PC08-
- PC13-
- PC12-
- PA06-
- PA07-
- PA14-
- PC09-
- PC10-
- PC01-
- PC11-
- PC02-
- PC03-
- PC05-
- PC04-
- PC07-
- PC06-
- PA09-
- PA13-
- PA02-
- PA08-
- PA10-
- PA11-
- PA04-
- PA05-
- PA03-
- PA12-

No grupo PAG houve a formação de um *cluster* (PA09, PA13, PA02, PA08, PA10, PA11, PA04, PA05) com similaridade mínima entre eles de 50,2%. A similaridade entre os dois grupos de oito indivíduos fora de 45,4%. Entre esses dois grupos ainda se formaram outros que mesclaram indivíduos do grupo PAG e PCG, um, mais próximo dividindo similaridade de 49,3% com o grupo PCG e outro mais distante com similaridade de 46,7% com o grupo PCG.

Resultados Clonagem e Sequenciamento

Um total de 987 clones foram sequenciados, sendo 504 clones de indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva generalizada (PAG) e 483 clones de indivíduos diagnosticados com periodontite crônica generalizada (PCG) (Tabelas 05, 06, 07, 08 – anexos 01 a 04). O valor de identidade de 97% fora colocado como limite para definição de homologia às espécies encontradas por meio do programa BLAST presente nos bancos de dados HOMD (Human Oral Microbiome Database – The Forsyth Institute – www.homd.org) e GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ao todo, 42 gêneros bacterianos foram encontrados, 35 gêneros em PCG e 37 em PAG, 19 gêneros comuns, 9 gêneros que se apresentaram apenas para o grupo PAG e 7 para o grupo de PCG. O número de novos filotipos que obtiveram um valor de identidade abaixo de 97% para o grupo PAG fora de 38 (54 clones), perfazendo 5,47% do total de clones avaliados. Para o grupo PCG o número de novos filotipos encontrado foi de 18 (31 clones), o que representa 3,14% do total de clones. Espécies ou filotipos já conhecidos foram, ao todo, 120 detectados. Setenta e sete táxons (espécies/filotipos) foram identificados entre as amostras de indivíduos com PCG e 80 para PAG. Entre o grupo PCG e PAG foram observados ao todo 34 táxons comuns, sendo 43 específicos para PCG e 46 específicos para PAG.

Algumas espécies foram encontradas em altas taxas entre os indivíduos (tabelas 05 e 07; figuras 10, 15 e 17). *Filifactor alocis* foi encontrado em 90% dos indivíduos de PCG (59 clones) e PAG (91 clones). *Tannerella forsythia* foi detectada em 90% (32 clones) dos indivíduos do grupo PCG e 80% do grupo PAG (44 clones). Outra espécie possivelmente patogênica, *P. gingivalis* foi encontrada em 70% do grupo PCG (54) e 50% do grupo PAG (29). Outras espécies que tiveram destaque tanto para PCG como PAG, respectivamente, foram: *Porphyromonas endodontalis*, 40% (9) e 50% (5);

Fusobacterium nucleatum ss nucleatum, 60% (53) e 60% (31); *T. denticola* 40% (7) e 40% (8). Algumas espécies se destacaram em um ou outro grupo. No grupo PCG, também foi observado em altas taxas, *Treponema lecithynoliticum*, 50% (5); *Campylobacter rectus* 40% (5); *Eikenella corrodens* 40% (5). Para o grupo PAG, foram observadas com relativa freqüência, *Eubacterium saphenum* 50% (14); *Parvimonas micros* 50% (12); *Eubacterium brachy* 40% (6); *F. nucleatum ss vincentii* 40% (8).

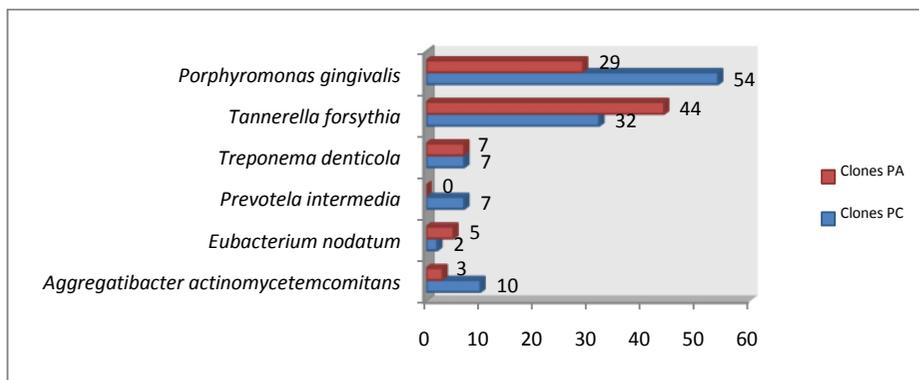


Figura 10. Total de clones das referidas espécies para os grupos de periodontite agressiva ou crônica.

Diversos táxons foram encontrados exclusivamente entre os grupos, porém, a maioria a uma baixa freqüência (tabelas 05 e 07 – Anexos 01 e 03). Para o grupo PCG, as espécies foram: *Treponema lecithinolyticum* (50%), *Selenomonas diana* (30%), *Prevotella pleuritidis* (20%), e contabilizando apenas 10%, foram encontrados: *Acinetobacter baumannii*, *Dialister pneumosintes*, *Gemella morbillorum*, *Leptotrichia buccalis*, *Neisseria mucosa*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Selenomonas infelix*, *Treponema maltophilum*, *Treponema putidum*. No grupo PAG as espécies exclusivas foram *F. nucleatum ss vincentii* (40%), *Afipia broomeae* (20%), *Lautropia mirabilis* (20%), *Streptococcus gordonii* (20%), e com freqüência de apenas 10% entre os indivíduos: *Actinomyces gerencseriae*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Atopobium parvulum*, *Capnocytophaga granulosa*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eubacterium minutum*, *Eubacterium saburreum*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Kingella oralis*, *Lautropia mirabilis*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria elongata*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria subflava*, *Prevotella denticola*, *Prevotella micans*, *Prevotella oralis*, *Prevotella salivae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Selenomonas artemidis*, *Streptococcus*

gordonii, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Veillonella dispar*.

Em relação àquelas espécies representadas por complexos de cor (Socransky *et al.*, 1998) e que foram detectadas em nosso estudo (figuras 11 e 12), a proporção de clones das espécies representativas do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) para periodontite crônica foi de 48,2% e para periodontite agressiva a proporção foi de 42,1%. O grupo laranja para PCG foi de 40,1% e para PAG, 31,8%. Com relação às espécies relacionadas a um padrão de saúde periodontal, definidas pelos complexos verde, amarelo, roxo e de actinomicetos (Socransky & Haffajee, 2002), respectivamente, para os grupos de PCG e PAG, foram encontrados 8,3 e 4,7% (verde), 1,6 e 8,9% (amarelo), 1,6 e 12,1% (roxo) e 0,0 e 0,5% (actinomicetos). Quando observados os complexos em relação ao total de clones obtidos (figuras 13 e 14) tivemos para os grupos PCG e PAG, respectivamente, 19,3 e 17,9% (vermelho), 15,9 e 13,5% (laranja), 3,3 e 3,8% (verde), 0,6 e 3,8% (amarelo), 0,6 e 5,2% (roxo) e 0,0 e 0,2% (actinomicetos).

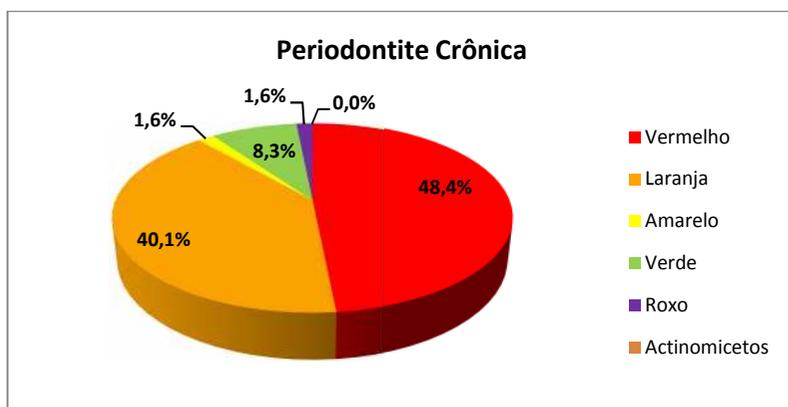


Figura 11 . Gráfico setorial da proporção de espécies bacterianas comumente analisadas por complexos de cor (Socransky & Haffajee, 2002; Socransky *et al.*, 1998) e que foram encontradas no grupo de periodontite crônica.

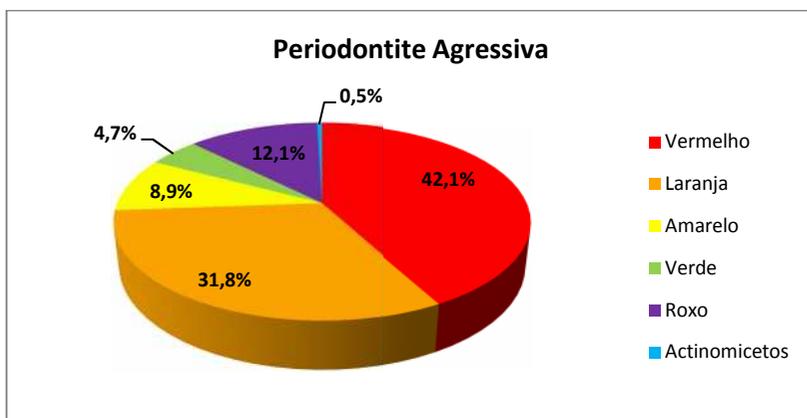


Figura 12. Gráfico setorial da proporção de espécies bacterianas comumente analisadas por complexos de cor (Socransky & Haffajee, 2002; Socransky *et al.*, 1998) e que foram encontradas no grupo de periodontite agressiva.

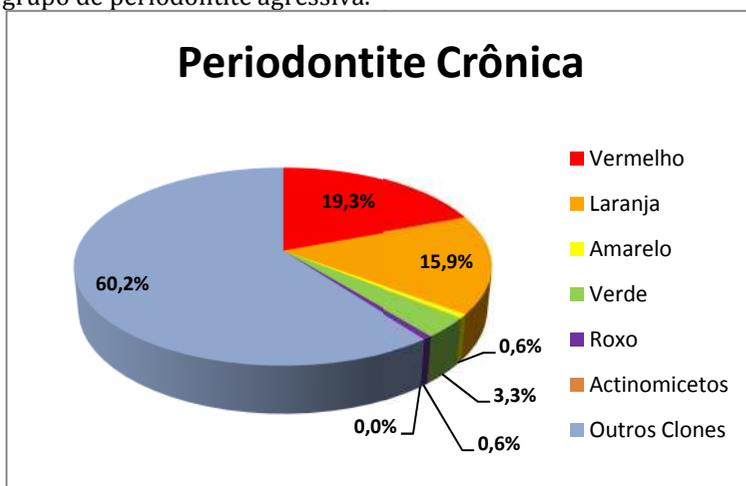


Figura 13. Gráfico setorial da proporção de espécies bacterianas comumente analisadas por complexos de cor (Socransky & Haffajee, 2002; Socransky *et al.*, 1998) em relação ao total de clones do trabalho e que foram encontradas no grupo de periodontite crônica.

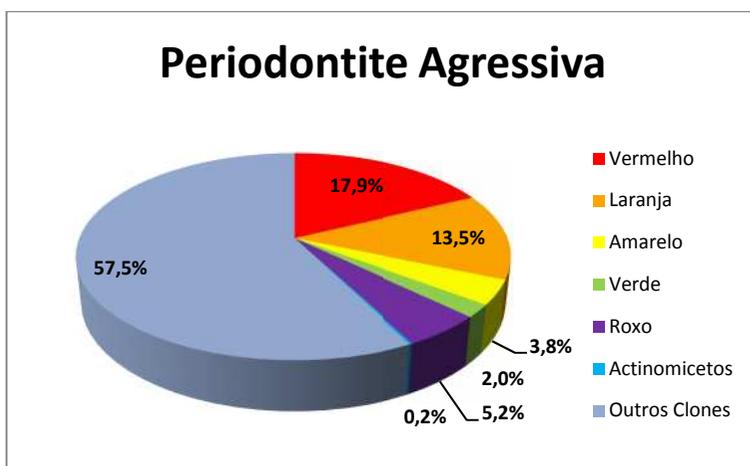


Figura 14. Gráfico setorial da proporção de espécies bacterianas comumente analisadas por complexos de cor (Socransky & Haffajee, 2002; Socransky *et al.*, 1998) em relação ao total de clones do trabalho e que foram encontradas no grupo de periodontite

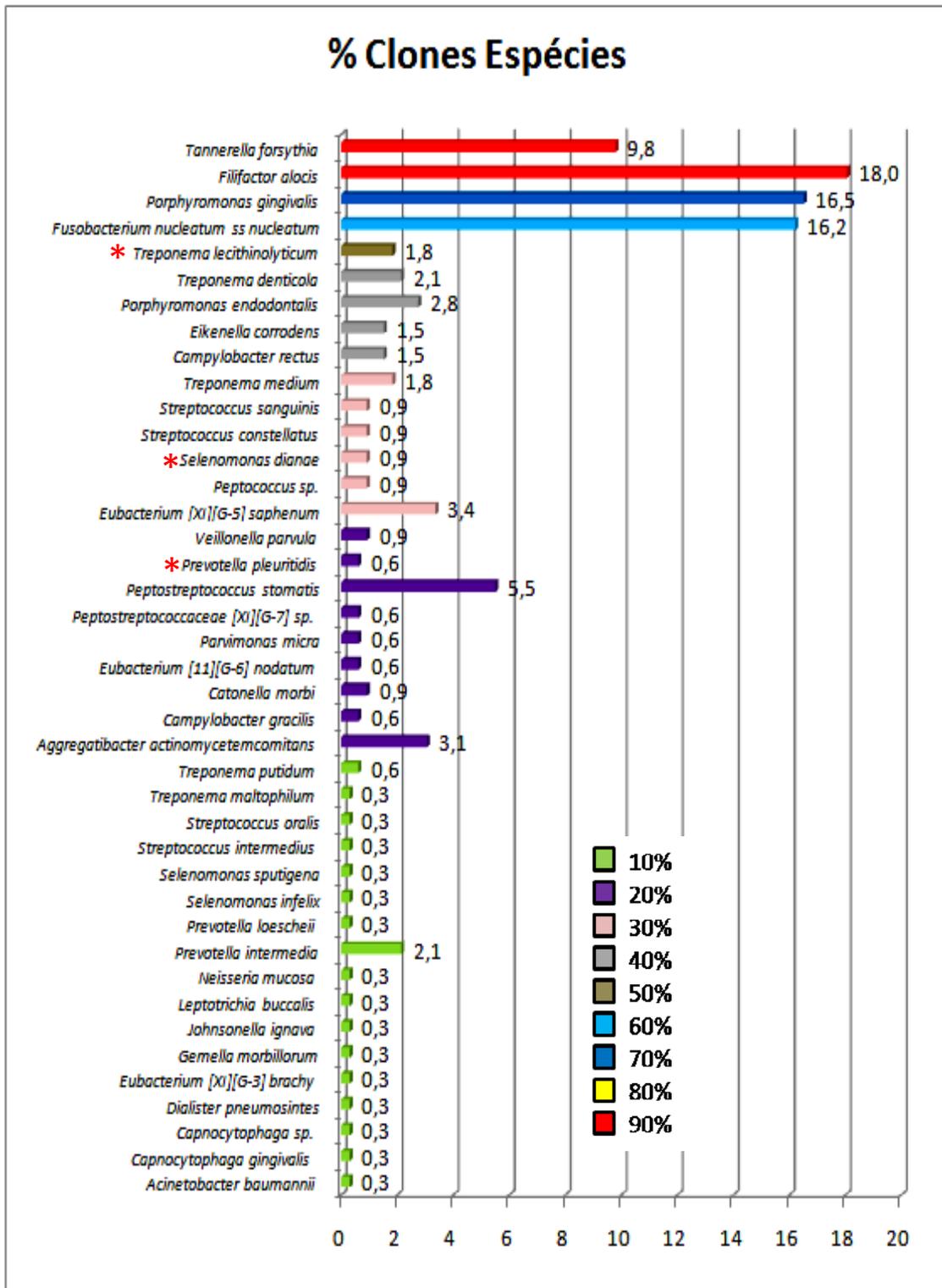


Figura 15. Porcentagem de clones de espécies do grupo periodontite crônica. As cores das barras representam a frequência com que foram encontrados cada representante de uma referida espécie nos indivíduos do grupo. * Táxons exclusivos dentro do grupo com prevalência $\geq 20\%$.

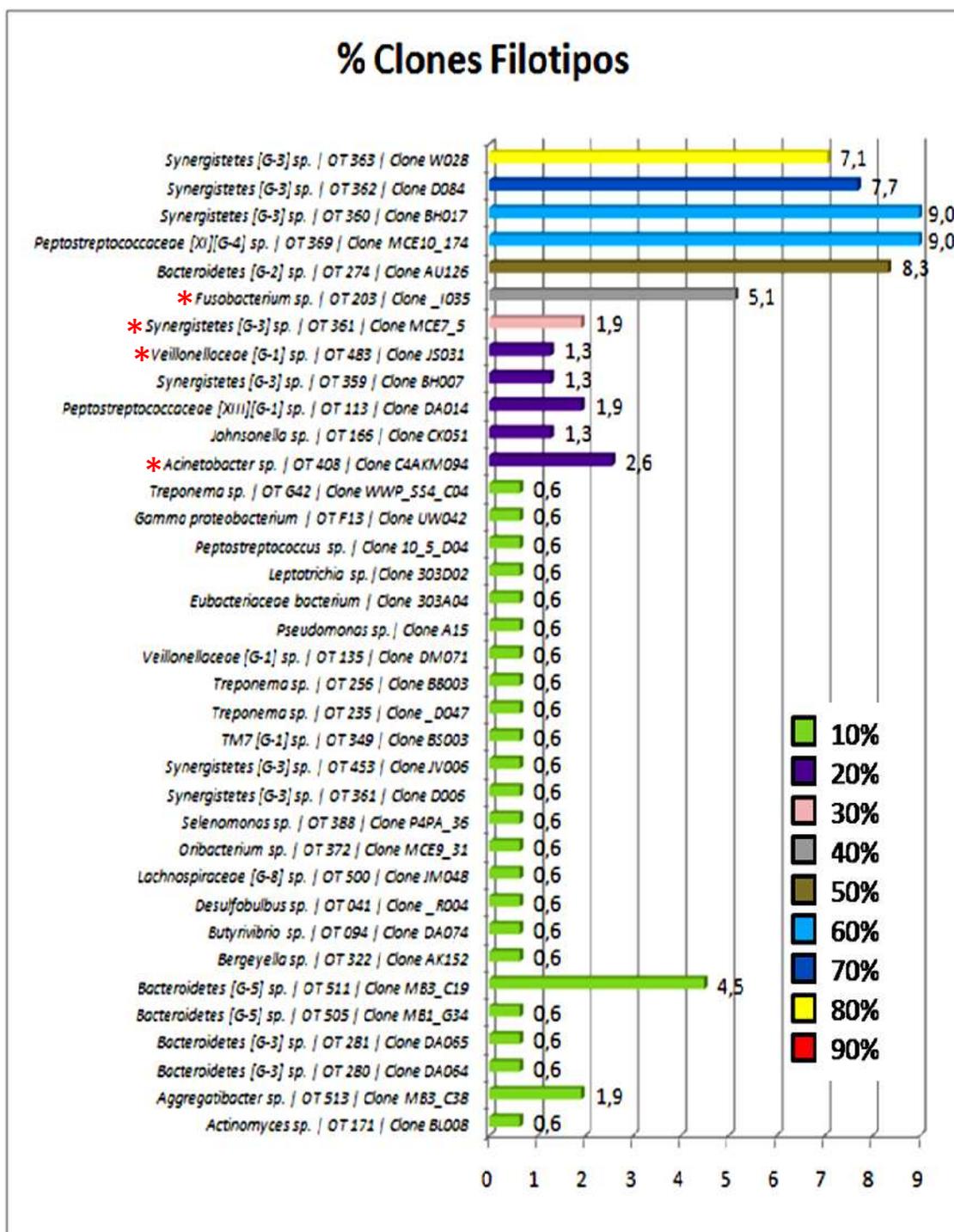


Figura 16. Porcentagem de clones de filotipos não-cultivados do grupo periodontite crônica. As cores das barras representam a frequência com que foram encontrados cada representante de um referido filotipo nos indivíduos do grupo. * Táxons exclusivos dentro do grupo com prevalência \geq 20%.

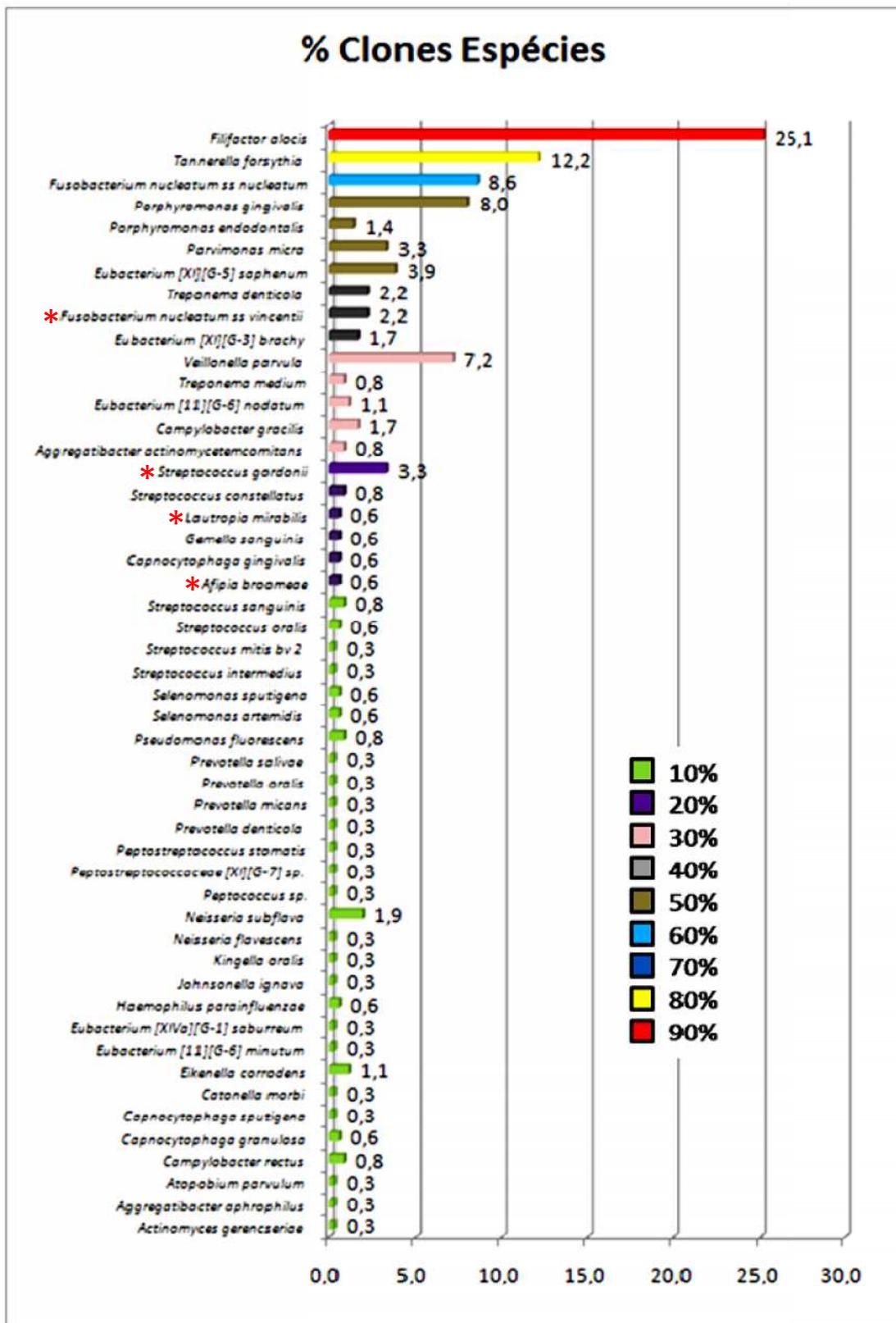


Figura 17. Porcentagem de clones de espécies do grupo periodontite agressiva. As cores das barras representam a frequência com que foram encontrados cada representante de uma referida espécie nos indivíduos do grupo. * Táxons exclusivos dentro do grupo com prevalência $\geq 20\%$.

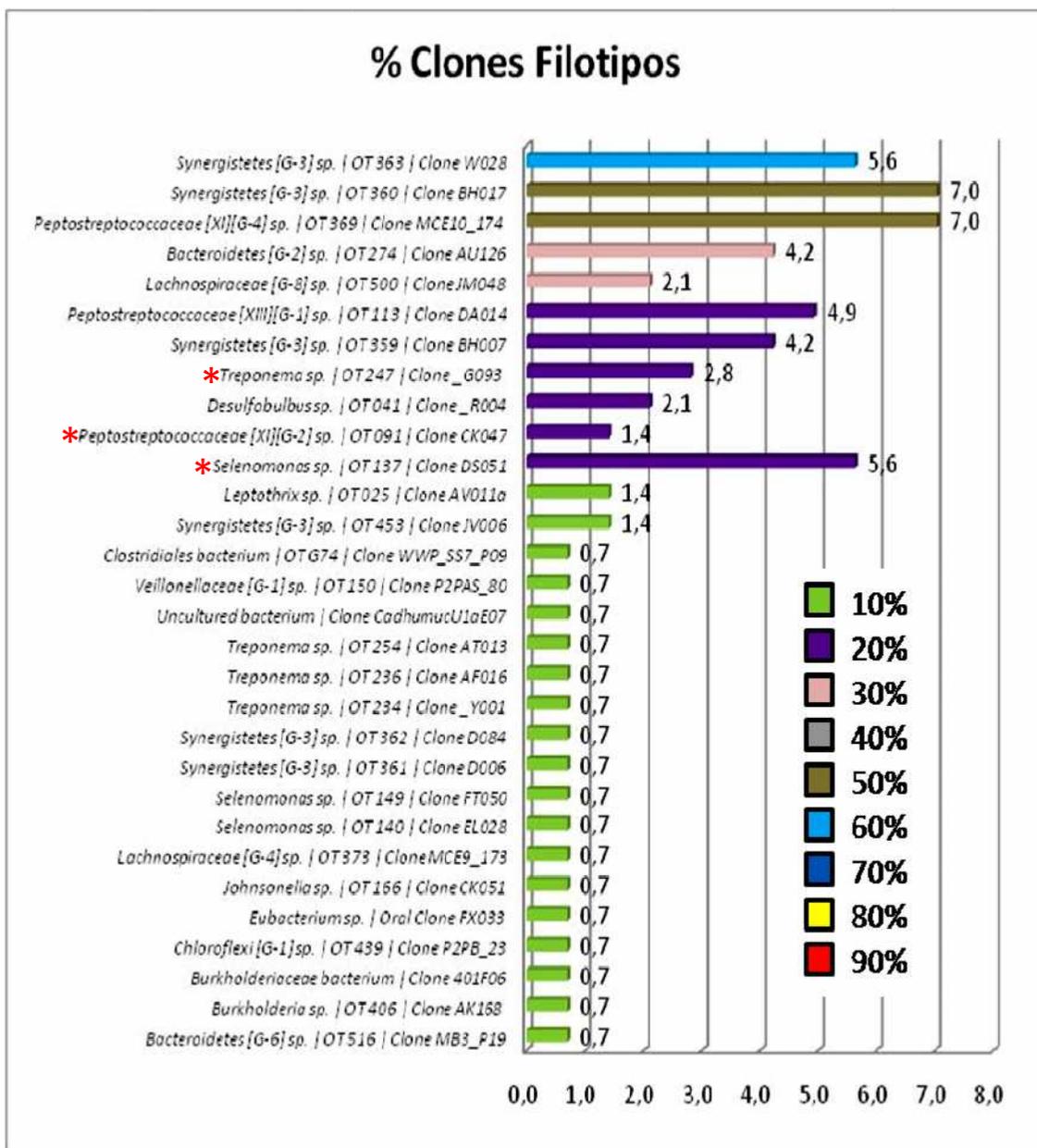


Figura 18. Porcentagem de clones de filotipos não-cultivados do grupo periodontite agressiva. As cores das barras representam a frequência com que foram encontrados cada representante de um referido filotipo nos indivíduos do grupo. * Táxons exclusivos dentro do grupo com prevalência \geq 20%.

Alguns filotipos (táxons não-cultivados) obtiveram destaque em nossos achados (ver figuras 16 e 18; tabelas 06 e 08 – Anexos 03 e 04), em especial para os filos *Synergistetes* e *Bacteroidetes* e para a família *Peptostreptococcaceae*. Foram encontrados em alta frequência para PCG e PAG, respectivamente, os filotipos: *Synergistetes* sp. clone W028 – 80 e 60%; *Synergistetes* sp. clone BH017 – 70 e 50%; *Bacteroidetes* sp. clone AU126 – 50 e 30%; e para *Peptostreptococcaceae* sp. clone

MCE10_174 – 60 e 50%. Apenas os filotipo *Synergistetes sp. clone D084* obteve destaque dentro do grupo PCG, em exclusividade, estando presente em 70% dos indivíduos de PCG e apenas em 10% dos indivíduos portadores de PAG e o filotipo *Fusobacterium sp. clone I035* que esteve presente em 40% dos indivíduos com PCG e não foi encontrado no grupo PAG. Outros filotipos foram encontrados em exclusividade, porém em baixa frequência entre os grupos. Para os filotipos do grupo PCG foram encontrados, em exclusividade, *Synergistetes sp. clone MCE7_5* (30%), *Veillonellaceae sp. clone JS301* (20%), *Acinetobacter sp. clone C4AKM094* (20%), entre outros com apenas 10% de frequência: (ver figura 18 e tabela 06). No grupo PAG somente três filotipo foram encontrado em exclusividade, mas com prevalência de apenas 20%: *Treponema sp. clone G093*, *Peptostreptococcaceae sp. clone CK047* e *Selenomonas sp. clone DS051*, sendo o restante de filos exclusivos para PAG encontrados apenas a 10%.

6 - DISCUSSÃO

Avaliação sobre as Amostras de Biofilme Subgengival por DGGE

Já está bem estabelecida na literatura a utilidade da técnica de eletroforese em gel de gradiente de desnaturação (DGGE) nos estudos qualitativos de perfis microbianos complexos, como é o caso do biofilme dental. A técnica de DGGE é capaz de separar, em gel, trechos de DNA/amplicons representativos a um valor de no mínimo 1% do total da amostra (Muyzer *et al.*, 1993).

Em nosso trabalho foi possível observar uma pequena formação de *clusters* entre indivíduos com periodontite agressiva generalizada e periodontite crônica generalizada. As amostras de bolsa moderada não apresentaram convergências para delinear os grupos de acordo com o quadro clínico, havendo apenas semelhanças isoladas entre dois ou até três perfis de bandas entre os grupos PCG e PAG. Por outro lado, o perfil de bandas profundas apresentou uma tendência à formação de pequenos *clusters* entre os grupos (figuras 08 e 09).

Tanto para o grupo PCG como para PAG, oito amostras de cada um apresentaram uma tendência à delimitação de um grupo relativamente semelhante. Estes pequenos grupos de PAG e PCG obtiveram semelhanças mínimas, respectivamente, de 50,2 e 53,6%, de similaridade sem interposição de representantes do outro grupo.

Apesar de não haver na literatura um valor relativo para se considerar como mínimo referente a um perfil microbiano, a técnica e metodologias utilizadas neste trabalho, apesar de um número relativamente pequeno de amostras, demonstraram uma tendência ao delineamento de perfis relativamente semelhantes com valores entre 50,2 a 68,4% de similaridade no perfil de bandas (UTO's).

Trabalhos com grandes números de indivíduos utilizando-se o DGGE para a análise das periodontites não são encontrados na literatura. Um grande obstáculo ainda é a quantidade de amostras que podem ser aplicadas em um único gel e a padronização destes géis. Em nosso trabalho todas as amostras tanto para PCG e PAG foram incluídas em dois géis (um de BP e outro para BM), todas as amostras foram preparadas em um único momento para o PCR do gene 16SrDNA (produto de ~1500 pb) e em um único momento para todas as amostras do *nested*-PCR, tentando, ao máximo não gerar

diferenças durante o preparo das amostras para serem incluídas no gel com gradiente de desnaturação.

Mayorga-Faad *et al.* (2007) avaliaram 84 pacientes com periodontite crônica e 59 com periodontite agressiva por meio de técnicas de cultivo. Um bom número, porém limitado, de testes foi utilizado para investigar algumas espécies determinadas. Nestes pacientes foram encontradas maiores frequências de *P. gingivalis* nos indivíduos com periodontite agressiva do que de *A. actinomycetemcomitans*. Todavia, não houve diferença com relação às espécies analisadas (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium spp*, *Dialister pneumosintes* e bastonetes entéricos) e os diferentes padrões clínicos de periodontite.

Por meio da técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, que possibilita a observação de perfis microbianos de várias espécies e diversos pacientes, e por meio de *Checkerboard Immunoblotting* Pícolos *et al.* (2005) testaram amostras de indivíduos com periodontite crônica localizada (n=11) ou generalizada (n=12) e agressiva localizada (n=15) e generalizada (n=19) para 15 sondas de DNA de espécies comuns a bolsas periodontais. Pícolos *et al.* (2005) não encontraram diferenças significativas entre os grupos de doença periodontal.

Em seu estudo Fujimoto *et al.*, 2003 avaliaram o perfil de quatro indivíduos (11 amostras) sendo apenas um indivíduo com periodontite juvenil (*sic*), com três amostras, e três com periodontite crônica. Nesse trabalho foi feita a comparação entre as amostras e testado a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* com oligonucleotídeos iniciadores para PCR específicos. Sete bandas do gel de DGGE foram extraídas, o material genético purificado, clonado e sequenciado. As bandas foram escolhidas de acordo com um padrão de altura de cepas puras. Foram sequenciados quatro clones de cada banda dominante (sendo a maioria escolhida de acordo com um padrão de altura idêntico ao padrão de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*). Dos 28 clones, 11 foram confirmadas para *P. gingivalis* e um para *A. actinomycetemcomitans*. Os autores acreditam que a técnica demonstrou-se interessante para definir espécies dominantes e definir diferentes perfis microbianos. Em nosso trabalho atual foi possível definir bandas dominantes, dentre diversas outras bandas

secundárias. Entretanto, por motivos técnicos, não foram realizadas as clonagens desses fragmentos para possível confirmação da identidade molecular destas bandas.

Em trabalho publicado em 2007, Ledder *et al.* compararam o perfil microbiano por meio de DGGE de 29 indivíduos com periodontite crônica (PC) e 18 indivíduos periodontalmente saudáveis (SP). Foi realizada uma análise do perfil das bandas entre os dois grupos. Entre 10 a 40 bandas foram encontradas por amostra. O padrão de banda de cada paciente na maioria das raias obteve níveis de similaridade entre 20 e 50% sendo o maior índice de similaridade com 70% (ocorrido entre uma amostra de PC e SP) e mínimas de até 10% de acordo com a análise de *cluster* por UPGMA. Houve uma tendência para a formação de grupos entre doença e saúde periodontal, porém esta não ficou totalmente delineada. Os autores discutem a possibilidade de ocorrer a existência de classes de estabilidade microbiana dentro do microambiente periodontal e que não somente a microbiota, mas outros fatores inclusive imunológicos e regionais poderiam afetar os tecidos periodontais.

Neste nosso trabalho as amostras apresentaram valores próximos com relação ao número de bandas por amostra (entre 16 a 36). Porém, não foi possível encontrar diferenças estatísticas entre os números de bandas entre indivíduos com PCG ou PAG, ou mesmo entre bolsas moderadas ou profundas. O número de bandas pode sugerir uma microbiota mais ou menos complexa, entretanto deve-se ter em mente que alguns micro-organismos podem possuir até 15 cópias do gene 16SrDNA em seu genoma (Pei *et al.*, 2010). A espécie *P. gingivalis*, por exemplo, pode apresentar três bandas em diferentes alturas (Fujimoto *et al.*, 2003), além de possíveis sobreposições de bandas de diferentes micro-organismos.

Em nosso trabalho foi observado no perfil de DGGE das bandas de 16SrDNA um padrão de similaridade maior entre as amostras em relação ao trabalho de Ledder *et al.* (2007), sendo a maioria na faixa de 40 e 70% de similaridade, com um valor mínimo de 33,1%. Como possíveis explicações das diferenças nos valores comparativamente ao trabalho de Ledder *et al.* (2007), temos que além de ter utilizado apenas uma amostra de biofilme ao invés de um *pool*, entre outras características metodológicas, são compreensíveis por se imaginar uma maior variação entre a microbiota de indivíduos saudáveis e com periodontite do que entre indivíduos com diferentes padrões clínicos de

doença, como foi no caso de nosso trabalho. Foi também observada uma tendência para a formação de grupos, porém com a presença de dois grupos maiores e distintos de PCG (8) e PAG (8) com variação de similaridade dentro do grupo entre 53,6-68,4% e 50,2-64,7%, respectivamente; e similaridade entre os dois grupos de 45,4%. O maior índice de similaridade também ocorreu entre os dois grupos (74,2%) e alguns dos menores valores de similaridade ocorreram entre dois indivíduos de cada grupo (PCG – 42,9% e PAG – 48,3%). Estes dois últimos indivíduos citados do grupo PAG estiveram igualmente distantes das outras amostras (33,1% de similaridade).

Sakamoto *et al.* (2003), utilizando T-RFLP, estudaram a diferença entre perfis microbianos entre indivíduos saudáveis (18) e com periodontite crônica (n=11) e agressiva (n = 7) por meio de amostras de saliva. Os pesquisadores observaram uma tendência de que as comunidades microbianas de periodontite crônica e agressiva se agrupassem em seus respectivos perfis de T-RFLP, entretanto, segundo os autores, este resultado não foi bem claro. Esse delineamento também não completamente definido entre 8 indivíduos de cada grupo foi observado em nosso estudo com a técnica de DGGE, que, assim como o T-RFLP, também utiliza oligonucleotídeos não específicos para a comparação de perfis microbianos.

Estudos comparativos de doença periodontal que não estão associados a sondas de DNA ou oligonucleotídeos iniciadores espécies-específicos ou meios de cultura seletivos são raros na literatura. A técnica de *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* é bastante utilizada para comparações semi-quantitativas de diversas espécies conhecidas por meio de sondas de DNA para um grande número de amostras. Entretanto esta limitação da técnica pode ter levado à falha em determinar diferenças estatísticas entre os grupos nos trabalhos que utilizaram esta técnica. Apesar de técnicas baseadas em PCR não poderem ser utilizadas na análise quantitativa, a técnica de PCR-DGGE possibilita uma ótima visão qualitativa. Uma das vantagens desta técnica, utilizada neste trabalho, é a possibilidade de se observar um perfil microbiano que envolve, inclusive, espécies possivelmente não cultivadas ou outras que não são em uma forma, simplesmente, pré-determinada. Amplia-se, desta forma, a possibilidade de se observar diferenças de perfis quando se lida com ambientes, como o biofilme subgingival, onde é possível encontrar aproximadamente 400 diferentes espécies bacterianas, sendo que

diversos estudos demonstram que valores entre 50 a 60% da microbiota ainda não foram cultivadas (Paster *et al.*, 2001).

Avaliação dos Dados por Análise Clonal do Gene 16SrDNA

A variabilidade de espécies/filotipos encontrados em cada trabalho depende da metodologia utilizada. Em nosso trabalho foi encontrado um total de 109 diferentes táxons conhecidos a partir de 987 clones produzidos de um total de 20 amostras subgingivais de bolsas profundas ($PS \geq 7\text{mm}$, uma por paciente) de 10 pacientes diagnosticados com periodontite crônica generalizada (PCG) e 10 pacientes diagnosticados com periodontite agressiva generalizada (PAG). Em trabalhos similares, como em Paster *et al.* (2001) encontrou-se 347 espécies ou filotipos de *eubacteria* em amostras subgingivais de biofilme de 11 pacientes com periodontite refratária (*sic*), nove com periodontite (*sic*), quatro com gengivite ulcerativa necrosante e cinco periodontalmente saudáveis utilizando-se de três pares de oligonucleotídeos iniciadores de *PCR*. Por meio de análise estatística de Boneh *et al.* (1998) estimaram ainda a possível presença de 68 espécies não detectadas nestas amostras, o que resulta em possíveis 415 espécies ou filotipos de *eubacteria* passíveis de habitarem o ambiente subgingival. Em outro trabalho mais recente de Lillo *et al.* (2006) utilizaram técnicas de cultura e clonagem para identificar 137 táxons (espécies ou filotipos) a partir de três amostras de dois pacientes com periodontite crônica localizada avançada com auxílio de três pares de oligonucleotídeos iniciadores. Desses 137 táxons, 86 foram identificados apenas por clonagem, 26 apenas por cultura e 25 encontrados pelas duas técnicas.

O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado para a análise clonal, de nosso estudo, foi o 27F/1492R, também utilizado por de Lillo *et al.* (2006) e que, segundo os autores, apresentou os melhores resultados em termos de número de filamentos e táxons individuais (tabela 03).

Em nosso trabalho, um total de 80 táxons foi identificado entre pacientes com periodontite agressiva generalizada, com 32 táxons comuns a pelo menos dois indivíduos (504 clones). Em seu estudo, Favari *et al.* (2008) encontraram 110 táxons a partir de um total de 1007 clones de amostras de três sítios periodontais de cada 10 indivíduos portadores de PA generalizada. Destas espécies/filotipos encontrados, 70 foram detectadas em pelo menos dois indivíduos.

Ohta *et al.*, (1986) ao estudar por meio de técnicas de cultura (ágar sangue e meio específico para *A. actinomycetemcomitans*) e identificação de diversos micro-organismos presentes nas amostras, encontraram uma microbiota mais heterogênea entre indivíduos com gengivite (um paciente) e periodontite do adulto (n=1) (atualmente periodontite crônica) do que indivíduos com periodontite de progressão rápida (n=5), periodontite juvenil (n=1). Sendo as duas últimas, atualmente, classificadas dentro de um único grupo, periodontite agressiva.

Em nosso trabalho foi encontrado uma maior variedade de espécies cultiváveis entre o grupo PAG (50 táxons) do que no grupo PCG (41 táxons). Deve-se levar em conta a vantagem da utilização de métodos biomoleculares em diferenciar espécies, enquanto que as técnicas de cultivo são mais laboriosas na diferenciação, mesmo se utilizando de métodos bioquímicos. As técnicas de cultivo possuem ainda a desvantagem de serem mais seletivas do que a utilização de oligonucleotídeos iniciadores de PCR para o gene 16SrDNA, o que despende uma necessidade de diferentes meios de cultura, amplo espaço e equipamento laboratorial para armazenagem, além da dificuldade de crescimento de alguns micro-organismos fastidiosos. Ao se comparar com a quantidade de gêneros, foi encontrado em PAG (35 gêneros) um número levemente menor do que em PCG (37).

Dentre as principais espécies relacionadas ao padrão de doença periodontal (*i.e.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) foi observado uma alta prevalência entre os indivíduos, exceto por *A. actinomycetemcomitans* (figuras 10, 15 e 17). *Tannerella forsythia* foi detectada em 80% dos indivíduos com PAG e 90% para os indivíduos com PCG. *Porphyromonas gingivalis* foi detectada em 50% dos indivíduos com PAG e 70% para PCG e, por fim, *T. denticola* foi detectado em 40% das amostras tanto de PAG, como PCG. Estas três espécies, segundo Socransky *et al.* (1998) são as mais correlacionadas com o padrão clínico de doença periodontal (profundidade de sondagem e sangramento à sondagem periodontais) e foram, nesse trabalho e em outros da mesma escola da microbiologia periodontal, designados como grupo do complexo vermelho. Outros grupos relacionados a padrões de saúde ou doença periodontal e designados por complexos de

diferentes cores apenas para facilitar didaticamente o estudo da microbiota periodontal em humanos (laranja, verde, amarelo, roxo e actinomicetos) foram correlacionados.

A espécie *A. actinomycetemcomitans* foi encontrada em baixos índices e prevalência em ambos os grupos (figuras 10, 15 e 17), tendo apenas 20% de frequência para os indivíduos do grupo PCG com 10 clones encontrados e 30% no grupo PAG com três clones. Este achado não nos surpreendeu, pois já é bem observado na literatura que em trabalhos de análise clonal do gene 16SrDNA, esta espécie é pouco observada. Faveri *et al.* (2008) por meio de análise clonal também não observou a presença desta espécie, mas a observou por meio de PCR comum para 16SrDNA de *A. actinomycetemcomitans* em 7 de 10 indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Em outro trabalho do mesmo grupo que comparou indivíduos com PC generalizada (n=30), PA generalizada (n=25, PAG), PA localizada (n=15, PAL) e indivíduos periodontalmente saudáveis (n=50, PH) por meio de técnica semi-quantitativa do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, não se observou diferença na quantidade ou prevalência de *A. actinomycetemcomitans* entre os grupos PCG e PAG, somente ocorrendo diferença no grupo PAL, com uma maior proporção para esta espécie (Faveri *et al.*, 2009). Além da especificidade, mesmo que relativamente baixa para o par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado, outro fator em que se acredita é na baixa representatividade na proporção de *A. actinomycetemcomitans* para indivíduos adultos com periodontite (Faveri *et al.*, 2008).

Outra espécie que foi associada com a periodontite agressiva generalizada foi o *Treponema lecithinolyticum* (Riep *et al.*, 2009) que foi encontrado em uma alta prevalência nestes indivíduos. Em nosso trabalho, todavia, foi observado um resultado oposto: a espécie *T. lecithinolyticum* fora encontrada apenas em indivíduos com periodontite crônica generalizada (50%; seis clones). Não há conclusão com relação a este resultado divergente. Possivelmente diferenças na técnica utilizada pelo autor (sonda de oligonucleotídeo espécie-específica marcada por digoxigenina e hibridização), um maior número de indivíduos e/ou fatores individuais da população estudada (geografia, etnia, etc.) em relação ao nosso estudo podem ter influenciado na resposta diferente encontrada por estes autores.

Em consciência dos limites da técnica de análise clonal, verificou-se a proporção dos clones encontrados para cada grupo de cor apresentado por Socransky *et al.* (1998) e observou-se que, com relação a apenas bactérias comumente sondadas nos trabalhos cujos autores utilizaram a técnica do *Checkerboard* (sondas de DNA cruzadas com várias amostras), as bactérias relacionadas ao complexo vermelho apresentaram-se com valores de 48,2% e 42,1%, respectivamente para os grupos de PCG e PAG (figuras 11 e 12). Estes valores estão próximos aos valores encontrados (25,51-33,28%) para o complexo vermelho em indivíduos brasileiros que nunca realizaram terapia periodontal anteriormente (Matarazzo *et al.*, 2008), todavia, com valores um pouco acima deste trabalho que procuraram por um número específico de espécies (40, ao todo) e que em nosso trabalho não foi possível detectar todas estas. Mesmo não tendo observado todas as 40 espécies comumente sondadas para os complexos de cor em nosso trabalho é interessante observar que obtivemos proporções próximas àquelas encontradas nos trabalhos que utilizaram técnicas de sondas de DNA e com valores similares para os complexos laranja e vermelho; sendo que estes dois grupos de bactérias, geralmente relacionadas a um padrão de doença, mostraram-se equivalentes entre si.

Nesses mesmos trabalhos também foram encontrados proporções semelhantes entre complexos laranja e vermelho em indivíduos com doença periodontal generalizada. Em nosso estudo, foram encontradas pequenas proporções de actinomicetos e estreptococos o que pode ser justificado por uma baixa sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores para estes gêneros ou devido à baixa proporção em relação a outras espécies presentes no biofilme subgengival, ou ainda, para o caso dos actinomicetos, pois se tratam de espécies ricas em C+G, o que poderia levar a uma falha na fase de extensão/síntese do amplicon durante a PCR pela Taq polimerase. Ao observar em relação ao total de clones obtidos, o complexo vermelho representou para PCG e PAG, respectivamente, 19% e 17% (figuras 13 e 14).

Dentre as espécies ultimamente associadas a quadros de doenças periodontais, alguns filotipos que se destacaram foram o do filo *Synergistetes*, em especial o clone D084, que esteve presente em 70% dos indivíduos com periodontite crônica, sendo este filo presente em 90% das amostras de PCG (figuras 16 e 18). Este grupo já foi amplamente discutido em trabalhos relacionados à Endodontia (Saito *et al.*, 2006),

sendo associado a lesões endodônticas com abscessos (Roças & Siqueira, 2005) e mesmo em indivíduos portadores de periodontite crônica, onde os clones BH017 e D084 (Kumar *et al.*, 2003) ou os clones A2F_22 e JV023 (Vartoukian *et al.*, 2009) estiveram fortemente associados à doença periodontal, além de ter uma importância também para casos de peritonite (Horz *et al.*, 2006; Vartoukian *et al.*, 2007). Apenas um indivíduo (10%) com periodontite agressiva generalizada apresentou o clone D084. Os clones BH017 (OTU 1) do filo *Synergistetes* estiveram presentes em 60% do grupo PCG e em 50% do grupo PAG. Ao todo, 28 clones do grupo *Synergistetes* foram encontrados no grupo de periodontite agressiva generalizada (5,55%) e 44 clones (9,10%) foram encontrados no grupo de periodontite crônica generalizada. Em nosso trabalho não foram identificados os clones A2F_22 e JV023 em nenhum dos indivíduos avaliados.

Outro filotipo fortemente relacionado à doença periodontal, *Bacteroidetes* sp. clone AU126 (Kumar *et al.*, 2003) foi encontrado em 30% dos casos de periodontite agressiva, com 6 clones; e em 60% dos casos de periodontite crônica com 13 clones (figuras 16 e 18, tabelas 06 e 08).

Alguns trabalhos revelaram valores de aproximadamente 60% de bactérias ainda-não-cultivadas para a microbiota bucal (de Lillo *et al.*, 2006; Aas *et al.*, 2005), sendo que para o gênero *Treponema* esses valores podem chegar a 75% (Dewhirst *et al.*, 2000). Quando observado no total de espécies ou filotipos e possíveis novas espécies, o grupo PCG apresentou uma proporção de 56,84% de filotipos não cultivados e, para PAG, encontramos que 57,63% dos táxons constituíam-se de filotipos não cultivados.

Faveri *et al.*, (2008) apresentaram, por meio de clonagem e sequenciamento, em um estudo descritivo de amostras de biofilme subgengival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada (n=10), uma grande variedade de espécies distintas (110) a partir de uma grande quantidade de clones (1007). Fora determinado um ponto de corte de similaridade entre os táxons de 98.5%. Setenta táxons foram encontrados com prevalência maior ou igual a 20%; destes, 40 (57%) correspondiam a espécies ainda não cultivadas.

Nossos achados corroboram os dados apresentados em outros trabalhos de que aproximadamente 60% da microbiota de *eubacteria* que pode ser encontrada no

biofilme subgingival poderia ainda não ter sido cultivada. Entretanto, acredita-se que algumas espécies já cultivadas, ainda não classificadas, poderiam representar alguns destes filotipos (Horz *et al.*, 2006; Paster *et al.*, 2001). Além disso, há um viés em se definir espécies apenas com base em dados moleculares o que poderia levar a definir alguma cópia do gene 16SrDNA ainda não sequenciada ou reconhecida de espécies já cultivadas a ser compreendida como uma diferente ou nova espécie. Se os táxons que obtiveram um escore abaixo de 97% (possíveis novos filotipos) não forem contabilizados o grupo PCG obteve um total de 50,0% de filotipos não cultivados e o grupo PAG, um menor valor de 35,3%. Ao que tange novas espécies, apesar de não terem sido sequenciadas em seus 1500 pb, encontramos que para o grupo PAG houve um total de 44 filotipos (4,45% dos 987 clones) e para PCG esse número foi de 25 (2,53% do total de clones avaliados).

Em nosso trabalho tivemos um número menor de táxons identificados em relação a outros trabalhos de análise clonal. Além da razão da utilização de apenas um par de oligonucleotídeos de PCR, utilizamos um ponto de corte de 97% de similaridade para diferenciar os clones em táxons. A maioria dos trabalhos utiliza valores de 99% de similaridade, o que pode contribuir com um maior número de espécies ao diferenciar em valores mais altos entre as sequências de nucleotídeos.

Alguns autores explicam que alguns micro-organismos podem ter em seu genoma seis cópias do gene do 16S rRNA com variações de até 1,5% entre elas (Janda & Abbott, 2007), ou seja, um único micro-organismo poderia ser classificado como dois, ou mais, caso fosse utilizado um ponto de corte de 99% de diferença mesmo que fossem sequenciadas as 1500 bases nitrogenadas do gene 16SrDNA. Além disso, foi demonstrado que das 883 sequências completas de genoma de procariotos no GenBank, 568 representam espécies, sendo que destas, 425 espécies possuíam entre 2 a 15 cópias do seu próprio gene 16SrDNA (Pei *et al.*, 2010) podendo ter variações entre elas de 0,06% até acima de 1% (24 espécies), chegando em uma espécie até 6,7%. Valores de similaridade com ponto de corte de 97% até 99% têm sido utilizados em diversos trabalhos (Janda & Abbott, 2007).

Nosso trabalho encontrou a partir dos oligonucleotídeos utilizados vários táxons exclusivos, porém poucos com prevalência $\geq 20\%$ e que se demonstraram exclusivos

entre os grupos. Dentre esses táxons no grupo PCG as espécies *T. lecithinolyticum*, *S. diana* e *P. pleuritidis* e os filotipos *Synergistetes* sp clone MCE7_5, *Fusobacterium* sp. clone I035, *Veillonellaceae* sp. clone JS301 e *Acinetobacter* sp. clone C4AKM094 foram os únicos observados com prevalência $\geq 20\%$ e no grupo PAG foram as espécies *Fusobacterium nucleatum* ss *vincentii*, *Afipia broomeae*, *Lautropia mirabilis* e *Streptococcus gordonii*, e os filotipos *Treponema* sp. clone G093, *Peptostreptococcaceae* sp. clone CK047 e *Selenomonas* sp. clone DS051. Houve também destaque para o filotipo *Synergistetes* clone D084 que esteve presente em 70% dos indivíduos com PCG e 10% apenas do grupo PAG. Deve-se ter em mente que não é possível afirmar sobre exclusividade entre estas espécies ou filotipos, pois estas poderiam apenas estar presentes em maiores proporções dentro dos respectivos grupos. A sondagem a partir de PCR com oligonucleotídeos específicos seria necessária para poder ter esta confirmação. Entretanto, não se pode descartar uma relativa importância de cada um destes táxons, caso estes sejam encontrados em maiores proporções entre os grupos.

Até a data da publicação deste trabalho não há estudos utilizando o mesmo oligonucleotídeo de iniciação de PCR para comparar periodontites crônica e agressiva generalizadas e, portanto, uma comparação mais precisa não é possível. Trabalhos que comparam os dois grupos ao utilizar outras técnicas como sondas de DNA (Faveri *et al.*, 2009) ou técnicas de cultura (Moore & Moore, 1994) encontraram poucas ou nenhuma diferença. Entretanto com a técnica de DGGE empregada neste estudo esta tendência à diferenciação foi observada entre os grupos em relação ao perfil de OTU's.

Diversos estudos comparativos têm demonstrado uma falta de concordância com relação ao perfil microbiano entre indivíduos, principalmente quando se observa os diferentes métodos diagnósticos utilizados e a amostragem. A falta de uma forte semelhança da microbiota periodontal apresentada entre os indivíduos em um mesmo grupo clínico ou não, devido a uma evolução única desta em cada paciente, juntamente com as alterações microbianas que podem ocorrer nas fases de quiescência e atividade das doenças periodontais podem ser as principais fontes de falhas nos estudos transversais na tentativa de caracterizar um perfil microbiano.

É importante questionar quão semelhantes devem ser as microbiotas para considerá-las compatíveis com um quadro clínico, pois talvez estas realmente estejam longe de terem valores de semelhança altos entre os indivíduos. Um dos pontos-chave talvez fosse a caracterização das espécies que estariam mais envolvidas durante os períodos de atividade da doença periodontal. Entretanto, há uma falta de indicadores efetivos desta atividade para o clínico.

7 - CONCLUSÕES

Dentro dos limites da metodologia empregada, o presente trabalho demonstrou que:

- Por meio da técnica de DGGE há uma tendência a um perfil microbiano comum entre as amostras de PCG e PAG, em especial nas amostras de sítios periodontais profundos, entretanto sem seu completo delineamento como dois grupos distintos microbiologicamente.

- Por meio da análise clonal foram observadas poucas diferenças entre a microbiota de PCG e PAG. Apesar de algumas espécies específicas para os dois grupos, houve grandes semelhanças com relação aos táxons mais encontrados (*F. alocis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* ss *nucleatum*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. endodontalis*, *Synergistetes* W028 e BH17) tanto no número de clones como prevalência entre os indivíduos dos dois grupos. Houve poucas diferenças encontradas em nível de espécies e filotipos entre PCG e PAG quando observados apenas aqueles que se apresentaram com prevalência acima de 20%. Os táxons *Treponema lecithinolyticum* e *Synergistetes* clone D084 destacaram-se entre indivíduos com PCG.

REFERÊNCIAS*

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11): 5721-32.

Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000.* 2002; 29: 31-69.

Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010; 53: 70-88.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6.

Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol.* 2006; 55(8): 1141-9.

Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1770-1780.

Caufield PW, Li Y, Dasanayake A. Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Compend Contin Educ Dent.* 2005; 26(5 Suppl. 1): 10-6.

Coenye T, Vandamme P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 7: 228(1): 45-9.

Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972; 69(8): 2110-4.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Davies CE, Hill KE, Wilson MJ, Stephens P, Hill CM, Harding KG, Thomas DW. Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microfloras of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(8): 3549-57.

da Cruz GA, de Toledo S, Sallum EA, Sallum AW, Ambrosano GM, de Cássia Orlandi Sardi J, da Cruz SE, Gonçalves RB. Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2008; 79(7): 1150-7.

de Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 61-8.

del Peloso Ribeiro E, Bittencourt S, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(9): 789-98.

Devillard E, Burton JP, Reid G. Complexity of vaginal microflora as analyzed by PCR denaturing gradient gel electrophoresis in a patient with recurrent bacterial vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005; 13: 25-31.

Doğan B, Antinheimo J, Çetiner D, Bodur a, Emingil G, Buduneli E et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J Periodontol.* 2003; 74: 803-14.

Downes J, Vartoukian SR, Dewhirst FE, Izard J, Chen T, Yu WH *et al.* *Pyramidobacter piscolens* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum 'Synergistetes' isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009; 59 (5): 972-80.

Duineveld BM, Kowalchuk GA, Keijzer A, van Elsas JD, van Veen JA. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel

electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:172-8.

Edgard RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research.* 2004; 32(5): 1792-97

Faveri M, Mayer MP, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23: 112-8.

Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MPA, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009; 36: 739-49.

Felsenstein J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics.* 1989; 5: 164-6

Fischer SG, Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell.* 1979; 16(1): 191-200.

Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80(6): 1579-83.

Florez AB, Mayo B. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int J Food Microbiol.* 2006; 110: 165-71.

Fujimoto C, Maeda H, Kokeguchi S, Takashiba S, Nishimura F, Arai H, Fukui K, Murayama Y. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of microbial communities of subgingival plaque. *J Periodontal Res.* 2003; 38: 440-5.

- Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A *et al.* Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol.* 2005; 76(2): 289-94.
- Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, van Elsas JD. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods.* 1999; 38: 1-15.
- Gjermeo P, Rösing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000.* 2002; 29: 70-8.
- Gold SI. Periodontics: The past. Part (1). Early Sources. *J Clin Periodontol.* 1985; 12: 79-97.
- Green GL, Brostoff J, Hudspith B, Michael M, Mylonaki M, Rayment N, Staines N, Sanderson J, Rampton DS, Bruce KD. Molecular characterization of the bacteria adherent to human colo-rectal mucosa. *J Appl Microbiol.* 2006; 100: 460-9.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999; 41:95-8.
- Horz H-P, Citron DM, Warren YA, Goldstein EJC, Conrads G. Synergistes group Organisms of human origin. *J C Microbiol.* 2006; 44(8): 2914-20.
- Hutter G, Schlagenhaut U, Valenza G, Horn M, Burgemeister S, Claus H, Vogel U. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology.* 2003; 149: 67-75.
- Ibekwe AM, Papiernik SK, Gan J, Yates SR, Yang CH, Crowley DE. Impact of fumigants on soil microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(7):3245-57.
- Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(9): 2761-4.

Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J Periodontol.* 1994; 65(11): 1073-8.

Kamma JJ, Nakou M, Gmür R, Baehni PC. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 314-21.

Kowalchuk GA, Stephen JR, De Boer W, Prosser JI, Embley TM, Woldendorp JW. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63: 1489-97.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003; 82: 338-44.

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8): 3944-55.

Janse I, Bok J, Zwart G. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods.* 2004; 57: 279-81.

Jumas-Bilak E, Carlier JP, Jean-Pierre H, Citron D, Bernard K, Damay A *et al.* *Jonquetella anthropi* gen. nov., sp. nov., the first member of the candidate phylum 'Synergistetes' isolated from man. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57(12): 2743-8.

Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS, McBain AJ. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73:516-23.

Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (1): 81-7.

Li Y, Ku CY, Xu J, Saxena D, Cawfield PW. Survey of oral microbial diversity using PCR-based denaturing gradient gel electrophoresis. *J Dent Res.* 2005; 84: 559-64.

Li Y, Saxena D, Barnes VM, Trivedi HM, Ge Y, Xu T. Polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis in the evaluation of oral microbiota. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21(5): 333-9.

Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol*. 1976; 47(1): 1-18.

Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol*. 1985; 56(8): 447-56.

Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SEB, Faveri M, Feres M. Clinical and Microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008; 35: 885-96.

Mayorga-Fayad I, Lafaurie GI, Contreras A, Castillo DM, Barón A, Aya Mdel R. Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogotá, Colombia: an epidemiological approach. *Biomedica*. 2007; 27(1): 21-33.

Michener CD, Sokal RR. A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution*, 11:130-162, 1957.

Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG et al. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun*. 1985; 48(2): 507-19.

Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun*. 1983; 42(2): 510-5.

Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Good IJ, Burmeister JA, Palcanis KG *et al*. Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect Immun*. 1982; 38(2): 651-67.

Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Hash DE, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun.* 1982; 38(3): 1137-48.

Moore LVH, Moore WEC, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Best AM *et al.* Bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res.* 1987; 66: 989-95.

Moore WE, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol.* 1991; 18(10): 729-39.

Moore LV, Moore WE. *Oribaculum catoniae* gen. nov., sp. nov.; *Catonella morbi* gen. nov., sp. nov.; *Hallella serogens* gen. nov., sp. nov.; *Johnsonella ignava* gen. nov., sp. nov.; and *Dialister pneumosintes* gen. nov., comb. nov., nom. rev., Anaerobic gram-negative bacilli from the human gingival crevice. *Int J Syst Bacteriol.* 1994; 44(2): 187-92.

Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994; 5: 66-77.

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59: 695-700.

Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton van Leeuwen.* 1998; 73: 127-41.

Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13: 3131-45.

Myers RM, Fischer SG, Maniatis T, Lerman LS. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13: 3111-29.

Navarrete AA. Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental [dissertação]. Piracicaba: USP/CENA; 2009.

Nielsen S, Nielsen DS, Lauritzen L, Jakobsen M, Michaelsen KF. Impact of diet on the intestinal microbiota in 10-month-old infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 44(5): 613-8.

Ohta H, Kokeguchi S, Fukui K, Kato K. *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans* in periodontal disease. *Microbiol Immunol.* 1986; 30(7): 629-43.

Papapanou PN. Population Studies of Microbial Ecology in Periodontal Health and Disease. *Ann Periodontol.* 2002; 7: 54-61.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001; 183: 3770-83.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and oral sites. *Periodontol 2000.* 2006; 42: 80-7.

Pei AY, Oberdorf WE, Nossa CW, Agarwal A, Chokshi P, Gerz EA, Jin Z *et al.* Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Apr 23. [Epub ahead of print]

Picolos DK, Lerche-Sehm J, Abron A, Fine JB, Papapanou PN. Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 1055-61.

Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF *et al.* Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol.* 2009; 47(6): 1705-11.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Aboim MC, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98 (6): 741-9.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Detection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 15; 250(2): 279-85.

Saito D, Leonardo R de T, Rodrigues JL, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 101-107.

Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J Med Microbiol.* 2003; 52:79-89.

Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17(5): 914-21.

Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 504-13.

Schabereiter-Gurtner C, Maca S, Rölleke S, Nigl K, Lukas J, Hirschl A, Lubitz W, Barisani-Asenbauer T. 16S rDNA-based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42 (6): 1164-71.

Schabereiter-Gurtner C, Maca S, Kaminsky S, Rölleke S, Lubitz W, Barisani-Asenbauer T. Investigation of an anaerobic microbial community associated with a corneal ulcer by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 43(3): 193-9.

Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *App Environ Microbiol.* 2005; 71 (3): 1501-6.

Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1989; 4: 47-51.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002; 28: 12-55.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(2): 134-44.

Tal M. Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek. *J Periodontol.* 1980; 51(11): 668-9.

The American Academy of Periodontology. Proceedings of the World Workshop in Periodontics. Ann Arbor. MI: University of Michigan. 1966: 69-126.

The American Academy of Periodontology. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: American Academy of Periodontology. 1989; 1/23-1/24.

van Steenberg TJ, van Winkelhoff AJ, van der Velden U, de Graaff J. Taxonomy, virulence and epidemiology of black-pigmented *Bacteroides* species in relation to oral infections. *Infection.* 1989; 17(3): 194-6.

Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. The division “*Synergistes*”. *Anaerobe.* 2007; 13: 99-106.

Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Diversity and morphology of the phylum “*Synergistetes*” in periodontal health and disease. *App Environ Microbiol.* 2009; 75(11): 3777-86.

Webster NS, Negri AP. Site-specific variation in Antarctic marine biofilms established on artificial surfaces. *Environ Microbiol.* 2006; 8: 1177-90.

Weerheijm KL, de Soet JJ, de Graaff J, van Amerongen WE. Occlusal hidden caries: a bacteriological profile. *ASDC J Dent Child*. 1990; 57(6): 428-32.

Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas J-Y, Alcantara-Maruri E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2006; 33: 869-77.

Zambon JJ, Reynolds HS, Slots J. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. *Infect Immun*. 1981; 32(1): 198-203.

Zijngel V, Harmsen HJ, Kleinfelder JW, van der Rest ME, Degener JE, Welling GW. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to study bacterial community structure in pockets of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18: 58-65.

ANEXO 01

Tabela 05. Número de clones por espécie para o grupo Periodontite Crônica.

Espécies	Clones
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	1
<i>Capnocytophaga sp.</i>	1
<i>Dialister pneumosintes</i>	1
<i>Eubacterium [XI][G-3] brachy</i>	1
<i>Gemella morbillorum</i>	1
<i>Johnsonella ignava</i>	1
<i>Leptotrichia buccalis</i>	1
<i>Neisseria mucosa</i>	1
<i>Prevotella intermedia</i>	7
<i>Prevotella loescheii</i>	1
<i>Selenomonas infelix</i>	1
<i>Selenomonas sputigena</i>	1
<i>Streptococcus intermedius</i>	1
<i>Streptococcus oralis</i>	1
<i>Treponema maltophilum</i>	1
<i>Treponema putidum</i>	2
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10
<i>Campylobacter gracilis</i>	2
<i>Catonella morbi</i>	3
<i>Eubacterium [11][G-6] nodatum</i>	2
<i>Parvimonas micra</i>	2
<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-7] sp.</i>	2
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	18
<i>Prevotella pleuritidis</i>	2
<i>Veillonella parvula</i>	3
<i>Eubacterium [XI][G-5] saphenum</i>	11
<i>Peptococcus sp.</i>	3
<i>Selenomonas diana</i>	3
<i>Streptococcus constellatus</i>	3
<i>Streptococcus sanguinis</i>	3
<i>Treponema medium</i>	6
<i>Campylobacter rectus</i>	5
<i>Eikenella corrodens</i>	5
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	9
<i>Treponema denticola</i>	7
<i>Treponema lecithinolyticum</i>	6
<i>Fusobacterium nucleatum ss nucleatum</i>	53
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	54
<i>Filifactor alocis</i>	59
<i>Tannerella forsythia</i>	32
TOTAL DE CLONES	327

ANEXO 02

Tabela 06. Número de clones por filotipo para o grupo Periodontite Crônica.

Filotipos (Não-cultivados)	Clones
<i>Actinomyces</i> sp. OT 171 Clone BL008	1
<i>Aggregatibacter</i> sp. OT 513 Clone MB3_C38	3
<i>Bacteroidetes</i> [G-3] sp. OT 280 Clone DA064	1
<i>Bacteroidetes</i> [G-3] sp. OT 281 Clone DA065	1
<i>Bacteroidetes</i> [G-5] sp. OT 505 Clone MB1_G34	1
<i>Bacteroidetes</i> [G-5] sp. OT 511 Clone MB3_C19	7
<i>Bergeyella</i> sp. OT 322 Clone AK152	1
<i>Butyrivibrio</i> sp. OT 094 Clone DA074	1
<i>Desulfobulbus</i> sp. OT 041 Clone _R004	1
<i>Lachnospiraceae</i> [G-8] sp. OT 500 Clone JM048	1
<i>Oribacterium</i> sp. OT 372 Clone MCE9_31	1
<i>Selenomonas</i> sp. OT 388 Clone P4PA_36	1
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 361 Clone D006	1
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 453 Clone JV006	1
TM7 [G-1] sp. OT 349 Clone BS003	1
<i>Treponema</i> sp. OT 235 Clone _D047	1
<i>Treponema</i> sp. OT 256 Clone BB003	1
<i>Veillonellaceae</i> [G-1] sp. OT 135 Clone DM071	1
<i>Pseudomonas</i> sp. Clone A15	1
<i>Eubacteriaceae bacterium</i> Clone 303A04	1
<i>Leptotrichia</i> sp. Clone 303D02	1
<i>Peptostreptococcus</i> sp. Clone 10_5_D04	1
<i>Gamma proteobacterium</i> OT F13 Clone UW042	1
<i>Treponema</i> sp. OT G42 Clone WWP_SS4_C04	1
<i>Acinetobacter</i> sp. OT 408 Clone C4AKM094	4
<i>Johnsonella</i> sp. OT 166 Clone CK051	2
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XIII][G-1] sp. OT 113 Clone DA014	3
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 359 Clone BH007	2
<i>Veillonellaceae</i> [G-1] sp. OT 483 Clone JS031	2
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 361 Clone MCE7_5	3
<i>Fusobacterium</i> sp. OT 203 Clone _I035	8
<i>Bacteroidetes</i> [G-2] sp. OT 274 Clone AU126	13
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-4] sp. OT 369 Cl. MCE10_174	14
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 360 Clone BH017	14
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 362 Clone D084	12
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 363 Clone W028	11
Clones Similaridade < 97%	36
TOTAL DE CLONES	156

ANEXO 03

Tabela 07. Número de clones por espécie para o grupo Periodontite Agressiva.

Espécies	Clones
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	1
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	1
<i>Atopobium parvulum</i>	1
<i>Campylobacter rectus</i>	3
<i>Capnocytophaga granulosa</i>	2
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	1
<i>Catonella morbi</i>	1
<i>Eikenella corrodens</i>	4
<i>Eubacterium</i> [11][G-6] <i>minutum</i>	1
<i>Eubacterium</i> [XIVa][G-1] <i>saburreum</i>	1
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	2
<i>Johnsonella ignava</i>	1
<i>Kingella oralis</i>	1
<i>Neisseria flavescens</i>	1
<i>Neisseria subflava</i>	7
<i>Peptococcus</i> sp.	1
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-7] sp.	1
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	1
<i>Prevotella denticola</i>	1
<i>Prevotella micans</i>	1
<i>Prevotella oralis</i>	1
<i>Prevotella salivae</i>	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3
<i>Selenomonas artemidis</i>	2
<i>Selenomonas sputigena</i>	2
<i>Streptococcus intermedius</i>	1
<i>Streptococcus mitis</i> bv 2	1
<i>Streptococcus oralis</i>	2
<i>Streptococcus sanguinis</i>	3
<i>Afipia broomeae</i>	2
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	2
<i>Gemella sanguinis</i>	2
<i>Lautropia mirabilis</i>	2
<i>Streptococcus constellatus</i>	3
<i>Streptococcus gordonii</i>	12
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	3
<i>Campylobacter gracilis</i>	6
<i>Eubacterium</i> [11][G-6] <i>nodatum</i>	4
<i>Treponema medium</i>	3
<i>Veillonella parvula</i>	26
<i>Eubacterium</i> [XI][G-3] <i>brachy</i>	6
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>vincentii</i>	8
<i>Treponema denticola</i>	8
<i>Eubacterium</i> [XI][G-5] <i>saphenum</i>	14
<i>Parvimonas micra</i>	12
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	5
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	29
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i>	31
<i>Tannerella forsythia</i>	44
<i>Filifactor alocis</i>	91
TOTAL DE CLONES	362

ANEXO 04

Tabela 08. Número de clones por filotipo para o grupo Periodontite Agressiva.

Filotipo (Não-cultivados)	Clones
<i>Bacteroidetes</i> [G-6] sp. OT 516 Clone MB3_P19	1
<i>Burkholderia</i> sp. OT 406 Clone AK168	1
<i>Burkholderiaceae bacterium</i> Clone 401F06	1
<i>Chloroflexi</i> [G-1] sp. OT 439 Clone P2PB_23	1
<i>Eubacterium</i> sp. Oral Clone FX033	1
<i>Johnsonella</i> sp. OT 166 Clone CK051	1
<i>Lachnospiraceae</i> [G-4] sp. OT 373 Clone MCE9_173	1
<i>Selenomonas</i> sp. OT 140 Clone EL028	1
<i>Selenomonas</i> sp. OT 149 Clone FT050	1
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 361 Clone D006	1
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 362 Clone D084	1
<i>Treponema</i> sp. OT 234 Clone _Y001	1
<i>Treponema</i> sp. OT 236 Clone AF016	1
<i>Treponema</i> sp. OT 254 Clone AT013	1
Uncultured <i>bacterium</i> Clone CadhumucU1aE07	1
<i>Veillonellaceae</i> [G-1] sp. OT 150 Clone P2PAS_80	1
<i>Clostridiales bacterium</i> OT G74 Clone WWP_SS7_P09	1
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 453 Clone JV006	2
<i>Leptothrix</i> sp. OT 025 Clone AV011a	2
<i>Selenomonas</i> sp. OT 137 Clone DS051	8
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-2] sp. OT 091 Clone CK047	2
<i>Desulfobulbus</i> sp. OT 041 Clone _R004	3
<i>Treponema</i> sp. OT 247 Clone _G093	4
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 359 Clone BH007	6
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XIII][G-1] sp. OT 113 Clone DA014	7
<i>Lachnospiraceae</i> [G-8] sp. OT 500 Clone JM048	3
<i>Bacteroidetes</i> [G-2] sp. OT 274 Clone AU126	6
<i>Peptostreptococcaceae</i> [XI][G-4] sp. OT 369 Clone MCE10_174	10
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 360 Clone BH017	10
<i>Synergistetes</i> [G-3] sp. OT 363 Clone W028	8
Clones Similaridade < 97%	54
TOTAL DE CLONES	142



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

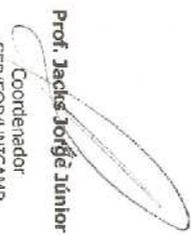


CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise da microbiota associada a bolsas periodontais por meio de eletroforese em gel com gradiente desnatante e sequenciamento do gene 16S rRNA", protocolo nº 030/2008, dos pesquisadores **SÉRGIO EDUARDO BRAGA DA CRUZ** e **REGINALDO BRUNO GONÇALVES**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02/04/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Periodontal pockets microbiota analysis by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rRNA gene sequencing", register number 030/2008, of **SÉRGIO EDUARDO BRAGA DA CRUZ** and **REGINALDO BRUNO GONÇALVES**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 02/04/2008.


Prof. Pablo Agustín Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jackis Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Note: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.