



MESTRADO EM ODONTOLOGIA

LUCAS FURTADO HYPOLITO GONÇALVES

**Níveis de *Selenomonas sputigena* e espécies de *Selenomonas* ainda não cultivadas no biofilme subgengival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada.**

Guarulhos

2011

LUCAS FURTADO HYPOLITO GONÇALVES

**Níveis de *Selenomonas sputigena* e espécies de *Selenomonas* ainda não cultivadas no biofilme subgengival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada.**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos  
para obtenção do título de mestre em Odontologia  
Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri

Guarulhos

2011

G635n	<p>Gonçalves, Lucas Furtado Hypólito</p> <p>Níveis de <i>Selenomonas sputigena</i> e espécies de <i>Selenomonas</i> ainda não cultivadas no biofilme subgengival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada. / Lucas Furtado Gonçalves. Guarulhos, 2011.</p> <p>51 f.; 31 cm</p> <p>Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Periodontia) - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2011.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri</p> <p>Bibliografia: f. 48-50</p> <p>1. Biologia Molecular. 2. Periodontite agressiva. 3. Bactéria <i>Selenomonas Sputigena</i>. 4. Doenças periodontais I. Título. II. Universidade Guarulhos.</p> <p>CDD 22<sup>st</sup> 617.632</p>
-------	---

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "NÍVEIS DE *SELENOMONAS SPUTIGENA* E ESPÉCIES DE *SELENOMONAS* AINDA NÃO CULTIVADAS NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA" em sessão pública realizada em 28 de Abril de 2011, considerou o candidato LUCAS FURTADO HYPOLITO GONÇALVES aprovado.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (UnG) \_\_\_\_\_ 

2. Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer (USP/ICB) \_\_\_\_\_ 

3. Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte (UnG) \_\_\_\_\_ 

Guarulhos, 28 de Abril de 2011.

*Dedico este trabalho ao esforço dos meus pais,  
pois sem eles, esse sonho não se tornaria  
realidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pois sem ele não estaria aqui para desfrutar desse momento tão importante da minha vida.

Aos meus pais, Jorge e Eugênia, pela minha formação e educação como pessoa e ser humano e pelo enorme esforço o qual os dois se submeteram para que eu conseguisse chegar até aqui. Muito obrigado, amo vocês.

Ao meu irmão Italo, por sempre estar do meu lado nas horas mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo de Faveri, por ter me dado essa oportunidade de conhecer um pouco da vida acadêmica, por me ajudar e orientar sempre que foi preciso e pela amizade que conquistamos ao longo desses 6 anos de convivência.

À minha namorada Gabriela, pela fidelidade e por estar ao meu lado mesmo nos momentos onde não pude dar a devida atenção que tanto merece. Te amo.

Aos professores, Prof. Dra. Poliana Mendes Duarte, Prof. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo, Prof. Dra. Caludia Otta Tsuzuki, Prof. Dra. Marta Bastos, Prof. Dr. Jamil Awad Shibli e Prof. Dra. Magda Feres por terem contribuído para minha formação acadêmica.

Aos demais professores da pós graduação que de alguma forma também contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos meus amigos Luciana Ap. Gouveia de Cardoso, Tatiane Onuma, Izaac, e em especial Antônio Carlos de Oliveira, por sempre me ajudarem nos momentos onde mais precisei. Muito obrigado.

Aos demais colegas e amigos, Josefa, Rafael Dias, Rafael Andreto, Verônica, Eísla, Renata, Jadson, Eduardo, Fernanda, pelo companheirismo e pela ajuda nesses dois anos de curso. Muito obrigado.

Às funcionárias e amigas Izilvânia, Cinthia e Adriana, por serem sempre tão atenciosas todos os dias em que passei pelo laboratório ou clínica. Muito Obrigado.

Aos demais funcionários pelo excelente funcionamento desta instituição.

Aos pacientes, pois sem eles não haveria meio de proporcionar essa pesquisa.

*‘Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso. Explore; viaje; descubra. Conheça.’*

*ALBERT EINSTEIN*



## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar no biofilme subgingival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada (PAG) a prevalência e os níveis de *Selenomonas sputigena* e espécies de *Selenomonas* ainda não cultivadas. Foram selecionados 30 indivíduos sistemicamente saudáveis, sendo 15 indivíduos com PAG e 15 indivíduos periodontalmente saudáveis (S). Os parâmetros clínicos analisados foram profundidade à sondagem (PS-mm), nível clínico de inserção (NCI-mm), presença ou ausência de placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração. Amostras de biofilme sugengival foram coletadas de 9 sítios méso-vestibulares nos indivíduos do grupo S e de 9 sítios (3 sítios com  $PS \leq 3$ mm e 6 sítios com  $PS \geq 5$ mm) nos indivíduos do grupo PAG. Essas amostras foram analisadas para os níveis de 10 espécies bacterianas, incluindo espécies cultiváveis e ainda não cultivadas usando a técnica “*RNA-oligonucleotide quantification*”. Em relação aos parâmetros clínicos, o grupo PAG apresentou maiores médias para todos os parâmetros clínicos em comparação ao grupo S ( $p < 0,05$ ). Indivíduos com PAG mostraram um aumento significativo nos níveis médios de *P. gingivallis*, *S. sputigena* e *Selenomonas* sp. CS002, enquanto *A. gerencseriae* e *S. sanguinis* foram encontrados em níveis superiores em indivíduos com S ( $p < 0,01$ ). *Selenomonas* sp. EW084 foi detectado somente no grupo PAG. Os níveis de *P. gingivalis* e *S. sputigena* no grupo PAG foram elevados nos sítios com  $PS \geq 5$ mm em comparação aos sítios com  $PS \leq 3$ mm ( $p < 0,05$ ). Além disso, as bolsas rasas dos indivíduos do grupo PAG apresentaram níveis de contagem destas duas espécies maiores comparados a bolsas rasas do grupo S ( $p < 0,01$ ). Estas espécies e *Selenomonas* sp. EW076 mostraram uma correlação positiva com o aumento da PS ( $p < 0,01$ ). Indivíduos do grupo PAG apresentaram um percentual significativamente maior de sítios colonizados por *P. gingivalis* e *S. sputigena* em comparação aos indivíduos S. Em conclusão, altos níveis e prevalência de *S. sputigena* e *Selenomonas* sp. CS002 foram encontrados no grupo PAG e o papel dessas espécies na patogênese da PAG deve ser investigado.

**Palavras chave:** *Selenomonas sputigena*, biologia molecular, 16S rRNA, doença periodontal agressiva generalizada, espécies ainda não cultivadas.

## ABSTRACT

The purpose of the present study was to determine in the subgingival biofilm from subjects with generalized aggressive periodontitis (GAgP) the prevalence and the levels of *Selenomonas sputigena* and not-yet-cultivated *Selenomonas* species. Thirty systemically healthy subjects were selected, including 15 subjects with GAgP and 15 subjects with periodontal health (PH). The analyzed clinical parameters were probing pocket depth (PD-mm), clinical attachment level (CAL-mm), presence or absence of visible dental plaque, gingival bleeding, bleeding on probing and suppuration. Samples of subgingival biofilm were collected from 9 mesial surfaces in the subjects of the group PH and of 9 sites (3 sites with  $PD \leq 3$ mm and 6 sites with  $PD \geq 5$ mm) in the individuals of the group GAgP. The samples were analyzed for 10 bacterial species, including cultivated and not-yet-cultivated taxa using RNA-oligonucleotide quantification technique. In relation to the clinical parameters, the group GAgP presented the highest mean for all clinical parameters in comparison with PH group ( $p < 0.05$ ). Subjects with GAgP showed significantly higher mean counts of *P.gingivalis*, *S. sputigena* and *Selenomonas* sp. CS002, while *A. gerencseriae* and *S sanguinis* were found in higher mean counts in subjects with PH ( $p < 0.01$ ). *Selenomonas* sp. EW084 were only detected in the GAgP group. The levels of *P. gingivalis* and *S. sputigena* in GAgP group were elevated in sites with probing depth (PD)  $\geq 5$ mm in comparison with sites with  $PD \leq 3$ mm. In addition, shallow pockets in subjects with GAgP showed higher mean counts of these two species compared with shallow pockets of PH subjects ( $p < 0.01$ ). These species and *Selenomonas* sp. EW076 showed a significantly positive correlation with increase of PD. Subjects from the group GAgP presented a significantly higher mean percent of sites colonized by *P.gingivalis* and *S. sputigena* in comparison with PH group. In conclusion, higher levels and prevalence of *S. sputigena* and *Selenomonas* sp. CS002 were found in GAgP subjects and their role in the pathogenesis of GAgP should be further investigated.

**Keywords:** *Selenomonas sputigena*, molecular biology, 16S rRNA, generalized aggressive periodontitis, not-yet-cultivated species.

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2.JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>3.PROPOSIÇÃO</b> .....	15
<b>4.MATERIAL MÉTODOS</b> .....	16
4.1. Seleção da população.....	16
<b>4.2.AVALIAÇÃO CLÍNICA</b> .....	16
<b>4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO</b> .....	17
4.3.1. Critérios de inclusão.....	17
4.3.2. Critérios de exclusão.....	17
<b>4.4. SELEÇÃO DOS SÍTIOS TESTES</b> .....	18
4.4.1. Coleta das amostras de placa subgengival.....	18
<b>4.5. MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO</b> .....	18
4.5.1. Extração de ácidos nucleicos totais.....	18
4.5.2. Preparação das sondas de 16S rRNA.....	19
4.5.3. Deposição das amostras.....	19
4.5.4. Hibridização.....	20
4.5.5. Detecção dos sinais.....	21
<b>4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	22
4.6.1. Monitoramento clínico.....	22
4.6.2. Monitoramento microbiológico.....	23
<b>5. ARTIGO</b> .....	24
<b>6.CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>ANEXO A</b> .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

As periodontites estão relacionadas com a presença de microrganismos específicos presentes no biofilme dental e podem ser classificadas em doenças periodontais crônicas ou doenças periodontais agressivas (DRESCHER et al., 2010; KISBY et al., 1989). A periodontite agressiva é uma infecção que atinge indivíduos sistemicamente saudáveis caracterizada por uma grande perda de inserção clínica associada a uma rápida destruição óssea alveolar ( ARMITAGE, 1999; LANG et al., 1999; TONETTI e MOMBELI, 1999). Esta infecção geralmente afeta indivíduos mais jovens e normalmente a destruição dos tecidos de sustentação do dente não são compatíveis com o acúmulo de biofilme supra e subgingival (ARMITAGE, 1999; MILLER et al., 1987; PILOT et al., 1991; TONETTI & MOMBELI, 1999;). Esta infecção pode ser classificada em relação à extensão clínica da doença em localizada ou generalizada (ARMITAGE, 1999, 2004; LANG et al., 1999).

As doenças periodontais são infecções de natureza polimicrobiana (SOCRANSKY & HAFFAJEE 2005; SOCRANSKY et al., 1998; TAL, 1980 ). Assim, um fator importante no estudo de qualquer infecção desta natureza é a caracterização das espécies patogênicas e das espécies compatíveis com o hospedeiro e/ou benéficas. Espécies cultiváveis, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* são considerados periodontopatógenos (HAFFAJEE & SOCRANSKY 2005; SLOTS & DAHLÉN 1985; SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY & HAFFAJEE 2005). Por outro lado, outras espécies são associadas com saúde periodontal, tais como espécies do gênero *Actinomyces* e *Streptococcus* (HAFFAJEE et al., 1985; HAFFAJEE et al., 1997; COLOMBO et al., 2005). Entretanto, a cavidade oral possui cerca de 700 espécies/filótipos, sendo que cerca de 35% ainda não foram cultivadas (CHEN et al., 2010; DEWHIRST et al. 2010). Desta forma, espécies que ainda não foram cultivadas podem estar associadas à saúde e/ou doença periodontal.

Os primeiros dados demonstrando a grande diversidade microbiana no ambiente subgingival de indivíduos com periodontite foram publicados por Paster et al. (2001). Os autores utilizaram os métodos de clonagem e sequenciamento do gene *16S rRNA* para estudar a diversidade bacteriana presente nas doenças periodontais. De um modo geral, este modelo é baseado no isolamento do DNA dos

microrganismos que se deseja estudar (ex: bactérias presentes na microbiota subgengival de bolsas periodontais), posterior amplificação da região *16s rRNA* pela reação em cadeia da polimerase (PCR), clonagem dos produtos obtidos desta amplificação em *Escherichia coli* e o posterior sequenciamento genético. Neste estudo, os autores encontraram cerca de 347 espécies/filotipos no ambiente subgengival. Um dado interessante, é que do total de espécies encontradas, 132 eram espécies já cultivadas e 215 eram filotipos que nunca haviam sido descritos anteriormente. Neste momento, os autores sugeriam que cerca de 415 e 500 espécies/filotipos poderiam colonizar o ambiente subgengival e a cavidade bucal, respectivamente. Posteriormente, outros estudos tiveram como objetivo o estudo da diversidade microbiana presente na cavidade bucal e relataram que 700 ou mais espécies/filotipos poderiam colonizar este ambiente (PASTER & DEWHIRST, 2009).

Investigações realizadas utilizando este modelo em amostras de biofilme subgengival de pacientes portadores de doença periodontal crônica (KUMAR et al., 2003,2005; PASTER et al., 2001; SAKAMOTO et al., 2000) e de doença periodontal agressiva generalizada (FAVERI et al., 2008) demonstraram a presença de novas espécies/filotipos de bactérias que poderiam estar associados às periodontites. Exemplos destas espécies/filotipos relacionadas à doença seriam *Deferribacteres* sp. D084 e BH017, *Megasphaera* sp. BB166 e CS025, *TM7* sp., *Eubacterium* sp. BB167, *Prevotella* sp. DO027, *Dialister* sp. GBA27, *Selenomonas* sp. EW084 e EW076, *Selenomonas* sp. CS002, *Porphyromonas* sp. BB136, *Peptostreptococcus* sp. AJ062, *Bacteroidetes* sp. AU126. Espécies/filotipos tais como, *Veillonella* sp. X042, *Deferribacteres* sp. W090, *Bacteroidetes* sp. BU063 são indicadas como relacionadas com a saúde periodontal (AAS et al., 2005; KUMAR et al., 2005).

Kumar et al. (2005) usando esta metodologia compararam a diversidade microbiana com o diferencial de analisarem em um mesmo estudo indivíduos com periodontite crônica e com saúde periodontal. Espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Veillonella*, *Campylobacter*, *Abiotrophia*, *Gemella*, *Capnocytophaga* e *Neisseria* foram associados à saúde periodontal. Por outro lado, espécies dos gêneros *Megasphaera*, *Desulfobulbus*, *Selenomonas*, *Dialister*, *Catonella*, *Tannerella* e *Treponema* foram encontradas em proporções elevadas nos indivíduos com periodontite. Os autores concluíram que outras espécies, além dos periodontopatógenos clássicos, poderiam estar associadas com as doenças

periodontais, porém novos estudos seriam necessários para que tais espécies fossem definidas.

Faveri et al. (2008) analisaram a diversidade bacteriana no ambiente subgengival de indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada (PAG). Os autores observaram uma alta diversidade bacteriana na microbiota desses indivíduos. *Selenomonas sputigena* foi a espécie mais prevalente, sendo encontrada em 9 entre 10 amostras, sendo que em 3 amostras esta espécie foi detectada em alta proporção variando de 19 a 30% da microbiota. Outras espécies de *Selenomonas* também estavam presentes em altos níveis, incluindo *Selenomonas* sp. EW084, *Selenomonas* sp. EW076, *Selenomonas* sp. P2PA\_80 e *Selenomonas* sp. CS002. Outras espécies predominantes foram *Dialister invisus*, *Anaeroglobus geminatus*, *Veillonella* sp. AA050, *Gemella morbillorum*, *Gemella* sp. strain 933-88 e *Capnocytophaga granulose*.

Entretanto, uma grande limitação da técnica de clonagem e sequenciamento genético é o fato da metodologia ser muito onerosa financeiramente, além de ocupar muito tempo de trabalho laboratorial. Isso faz com que o número de amostras analisadas seja pequeno. Outros aspectos a serem considerados são os vieses que a própria técnica de amplificação pode induzir em amostras multigenômicas gerando bibliotecas genômicas diferentes. De Lillo et al. (2006) utilizaram 3 *primers* universais para bactérias e observaram que bibliotecas genômicas diferentes foram encontradas após a utilização do mesmo molde de DNA proveniente de amostra de biofilme subgengival. Bonnet et al. (2002) demonstraram diferentes resultados variando-se o número de ciclos de amplificação de 10 até 25 ciclos. Além disso, métodos de extração de DNA também podem influenciar a biblioteca genômica formada (SCUPHAM et al., 2007; ZOETENDAL et al., 2001). Os mecanismos que causam estes diferentes resultados a partir do mesmo molde de DNA não são conhecidos e necessitam de mais investigações.

Recentemente, uma nova metodologia descrita por Preza et al. (2009) vem sendo utilizada nos estudos de ecologia bacteriana na cavidade bucal. Esta metodologia é baseada em um teste de *microarray*. Resumidamente, esta técnica utiliza um *microship*, que é constituído de uma matriz de vidro. Esta matriz contém as chamadas sondas, ou sequência genética específica, que são sequências de ácidos nucleicos de parte do gene *16S rRNA* de aproximadamente 300 diferentes espécies/filotipos bacterianas, incluindo espécies ainda não cultivadas. As sondas

são depositadas na matriz de maneira análoga a uma impressora, por meio de uma impressão a laser. O DNA é extraído da amostra a ser estudada, posteriormente é amplificado por uma reação de PCR e em seguida é hibridizado nos “arrays”. Os “arrays” são processados e as reações positivas com as sondas são detectadas por meio de um scanner (PASTER et al. 2009). Possui uma grande vantagem em relação aos estudos de clonagem e sequenciamento que é o fato de poder avaliar um grande número de amostras e espécies. Todavia, esta metodologia possui as mesmas limitações em relação aos vieses de amplificação descritos anteriormente. Outro fato importante é que esta metodologia não é capaz de quantificar os níveis das espécies bacterianas avaliadas.

Uma vez que os níveis dos microrganismos é um ponto importante na etiologia das doenças periodontais (HAFFAJEE et al., 1988; LISTGARTEN 1976; SOCRANSKY et al.,1998), e que a descrição somente da prevalência das espécies possui um baixo poder de associação com as doenças periodontais, pouco se sabe sobre o verdadeiro papel das espécies ainda não cultivadas na etiologia das doenças periodontais. Desta forma, o desenvolvimento de uma metodologia que tivesse a capacidade de estudar a prevalência e os níveis de espécies ainda não cultivadas em um grande número de amostras seria de grande valia para alcançar este objetivo.

O *Checkerboard DNA-DNA hybridization* descrito por Socransky et al. (1994) é uma ferramenta útil no estudo de um grande número de amostras para um grande número de espécies bacterianas ao mesmo tempo, entretanto, o uso de sondas genômicas não permite sua utilização para espécies que ainda não foram cultivadas. Entretanto, recentemente Teles et al. (2011) desenvolveram uma técnica cujo princípio pode ser aplicado em espécies cultiváveis e ainda não cultivadas para um grande número de amostras. O “*RNA-oligonucleotide quantification technique*” (ROQT) se baseia na extração dos ácidos nucléicos totais (DNA e RNA) da amostra e posterior hibridização com as sondas de oligonucleotídeos (similares ao teste de microarray). Possui a vantagem de identificar qualquer espécie para a qual se desenhe uma sonda, seja um microrganismo que já foi cultivado ou um microrganismo ainda não cultivado; elimina o risco de reações cruzadas e ainda torna possível quantificar os níveis e proporções destas novas espécies. A metodologia não necessita de amplificação do DNA, o que evita os vieses de amplificação, e por utilizar uma sonda universal *16S rRNA* para bactérias poderá

mensurar a real proporção de uma espécie alvo no ambiente subgengival após aprimoramento da técnica.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Considerando os resultados descritos pelos estudos de metagenômica, com destaque aos achados prévios de Faveri et al. (2008) que evidenciaram a grande diversidade de espécies de *Selenomonas* presentes no biofilme subgengival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada, a busca sobre o possível envolvimento de novas espécies bacterianas ainda não cultivadas na etiologia das doenças periodontais é indiscutível. Dessa forma, devido ao pequeno número de amostras analisadas e as limitações em relação à capacidade de quantificar os níveis das espécies bacterianas analisadas pela técnica de clonagem e seqüenciamento levantam questionamentos em relação a alguns resultados obtidos pela técnica. Desta forma, fazem-se necessários estudos que avaliem a prevalência e os níveis de espécies ainda não cultivadas em um maior número de indivíduos e amostras para verificar o verdadeiro papel da *S. sputigena* e de espécies de *Selenomonas* ainda não cultivadas na etiologia da periodontite agressiva generalizada.



### 3. PROPOSIÇÃO

Avaliar a prevalência e os níveis de *Selenomonas sputigena* e espécies de *Selenomonas* ainda não cultivadas em amostras de biofilme subgingival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada por meio da técnica “*RNA-oligonucleotide quantification*”.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Seleção da população

Foram selecionados 15 indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada (grupo PAG) e 15 indivíduos com saúde periodontal (grupo S - controle). Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo, seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e forma de coleta de amostras. Os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, responderam a um questionário de saúde/anamnese e receberam a terapia periodontal gratuitamente, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Guarulhos (Nº197/2009 – Anexo A).

### 4.2. Avaliação clínica

O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador previamente treinado e calibrado (ARAUJO et al, 2003) no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo e selecionar os sítios-teste. Todos os dentes, exceto os terceiros molares, foram avaliados em 6 sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), para os seguintes parâmetros:

-Índice de placa visível - IPV (AINAMO e BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa dentária supragengival visível, após lavagem e secagem dos dentes.

-Índice de sangramento gengival – ISG (AINAMO e BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento na gengiva marginal após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival.

-Profundidade de sondagem – PS: distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

-Nível clínico de inserção - NCI: distância, em milímetros, entre a junção esmalte-cimento e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

-Sangramento à sondagem - SS: presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento após 20 segundos da sondagem com sonda periodontal milimetrada.

-Supuração: presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de supuração após 20 segundos da sondagem com sonda periodontal milimetrada.

Para estes exames foram utilizadas sondas periodontais milimetradas tipo PCPUNC-BR 15 (HuFriedy do Brasil, RJ, RJ, Brasil).

### **4.3. Critérios de inclusão e exclusão**

#### 4.3.1 Critérios de inclusão

Periodontite agressiva generalizada (PAG)

Os indivíduos foram selecionados baseado nos critérios propostos pela Academia Americana de Periodontia (AAP) (ARMITAGE 1999). Os seguintes critérios foram utilizados:

- $\leq 35$  anos de idade;
- Possuir no mínimo 20 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal apresentando PS e NCI  $\geq 5$ mm, não contíguos, localizados nas regiões de primeiros molares e incisivos, e mais 6 dentes com as mesmas características clínicas localizados em grupos dentários diferentes;
- Apresentar histórico de doença periodontal agressiva na família (ao menos um membro da família que apresenta ou apresentou histórico de periodontite) (Faveri et al, 2009).

Indivíduos com saúde periodontal (S)

- $\leq 35$  anos de idade;
- Possuir no mínimo 20 dentes excluindo-se os terceiros molares;
- Não apresentar sítios com PS  $> 3$ mm e comcomitante NCI  $> 3$  mm;
- Não apresentar sinais clínicos de gengivite localizada ou generalizada;
- Não apresentar mais de 10% dos sítios com sangramento à sondagem e/ou sangramento gengival.

#### 4.3.2 Critérios de exclusão

Os seguintes critérios de exclusão foram observados para ambos os grupos: fumo; gravidez ou amamentação; tratamento periodontal previo; uso de antibióticos sistêmicos nos últimos seis meses; uso de antissépticos bucais nos últimos seis meses; história de doença sistêmica que comprometa a resposta do hospedeiro.

#### **4.4. Seleção dos sítios testes**

Nos indivíduos com PAG foram selecionados aleatoriamente 9 sítios subgingivais não contíguos em quadrantes distintos, sendo 3 sítios com profundidade de sondagem (PS)  $\leq 3$ mm e 6 sítios com PS  $\geq 5$ mm. Nos indivíduos com saúde periodontal foram coletados 9 sítios com PS  $\leq 3$ mm que não apresentavam sangramento à sondagem e sangramento gengival.

##### **4.4.1 Coleta das amostras de placa subgingival**

Em ambos os grupos, após a remoção da placa supragengival a coleta de amostras de biofilme subgingival foi feita com curetas Gracey do tipo mini-five (HuFriedy, EUA), posicionadas na porção mais apical dos sítios selecionados. As amostras foram depositadas em tubos de polipropileno de 1,5 ml contendo 100  $\mu$ l de solução TE RNase-free (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). O material coletado foi armazenado à temperatura de  $-80^{\circ}$  C, por no máximo 48h, quando os ácidos nucleicos totais (ANT) foram extraídos.

#### **4.5. Monitoramento microbiológico**

##### **4.5.1 Extração de Ácidos Nucleicos Totais**

O ANT das amostras foi extraído utilizando o kit Epicenter Masterpure DNA & RNA Purification kit (Epicentre, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, as superfícies das bancadas e aparatos foram tratadas com substância inibidoras de ribonucleases (RNaseAWAY<sup>®</sup> – Invitrogen, San Diego, CA, EUA) para minimizar o risco de degradação dos ácidos nucleicos. O tubo contendo a amostra foi retirado do freezer  $-80^{\circ}$  C e mantido em gelo por 10 minutos para descongelamento. O tubo coletor foi agitado em vortex por 1 minuto e a solução foi transferida para um novo tubo. Para a lise do material coletado, adicionou-se 1,0  $\mu$ L de solução de proteinase K (50 $\mu$ g/ $\mu$ L) aos 100  $\mu$ L da solução de TE da amostra, e posteriormente incubado a  $65^{\circ}$  C, por 15 minutos. As amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos antes do procedimento de precipitação dos ácidos nucleicos totais, segundo orientações do fabricante. O material precipitado foi ressuspense em 25  $\mu$ L de TE e armazenado à  $-80^{\circ}$  C.

#### 4.5.2 Preparo das sondas de 16S rRNA

As sondas de oligonucleotídeos para as espécies que já foram cultivadas e para as espécies ainda não cultivadas possuíam cerca 18-22 nucleotídeos e mínimas estruturas secundárias na região conservada do gene 16S rRNA para organismos procariontes. A sequência das sondas foram cedidas gentilmente pelo Prof. Bruce Paster e recentemente foram publicadas (PREZA et al., 2009). Todas as sondas foram conferidas no sistema do *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>) e posteriormente sintetizadas (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Os controles constituíram-se de sequências complementares às sondas. As sondas foram marcadas com digoxigenina utilizando um kit específico para oligonucleotídeos, segundo as especificações do fabricante na concentração final de 4,5 pM/μL (DIG Oligonucleotide 3'- End labeling kit, 2<sup>nd</sup> Generation – Roche, Indianápolis, IN, EUA). De uma forma geral, em um tubo estéril de 200 μL foi adicionado 100 pM da sonda para um volume final de 10 μL. Posteriormente, 4 μL de uma solução tampão, 4 μL de uma solução 5mM de CoCl<sub>2</sub>, 1 μL de uma solução 0,05mM de DIG-ddUTP e 1 μL da enzima transferase (20U/μL) foram adicionados. Esta solução foi incubada 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi retirada e colocada em gelo por 5 minutos e 2 μL de uma solução 0,2mM EDTA (pH 8.0) foi adicionada para interromper a reação.

A Tabela 1 descreve as sequências das sondas e dos controles selecionados.

#### 4.5.3 Deposição das amostras

Após a quantificação da concentração dos ANT das amostras (NanoDrop, Thermo Scientific, EUA) as alíquotas de 25 μl contendo todo o ANT obtido de cada amostra foram adicionadas a 90μL de glutaraldeído 2% (Ted Pella, Redding, CA, EUA) e 910 μL de 6 X de tampão salina citrato (SSC) totalizando o volume de aproximadamente 1.025 μL que foi depositado diretamente em membrana de nitrocelulose (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, EUA) de 15 x 15 cm posicionada no aparato MiniSlot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA). Nas últimas duas canaletas do sistema foram adicionados os controles da reação (oligonucleotídeos complementares às sondas, Tabela 1). Os controles de todas as sondas foram aliquotados em um mesmo tubo para obtenção de uma concentração

final de 0,004 e 0,04  $\mu\text{M}$  de cada seqüência, correspondendo a  $10^5$  e  $10^6$  células, respectivamente (Teles et al. 2011). Foram adicionados aos controles alíquotas de 90  $\mu\text{L}$  de glutaraldeído 2% (Ted Pella, Redding, CA, EUA) e 910  $\mu\text{L}$  de 6 X de tampão salina citrato (SSC) para obtenção de um volume de aproximadamente 1000  $\mu\text{L}$ , e estes foram depositados diretamente na membrana. A membrana foi removida do aparato e os ANT depositados foram então fixados por aquecimento em forno a 120 °C por 20 min.

**Tabela 1.** Sequências das sondas de oligonucleotídeos utilizadas para espécies já cultivadas.

Espécie/Filotipo	Sonda (5'-3')	Controle (3'-5')
<i>Selenomonas sputigena</i>	CCGTCACCCAAACTCAAT	GGCAGTGGGTTTGAGTTA
<i>Selenomonas noxia</i>	CTATTCGCATTAGGCACG	GATAAGCGTAATCCGTGC
<i>Selenomonas sp. EW084</i>	CCGTCATTACAGAGCACT	GGCAGTAATGTCTCGTGA
<i>Selenomonas sp. EW076</i>	CTCTGCATGCTTCAGTCA	GAGACGTACGAAGTCAGT
<i>Selenomonas sp. CS002</i>	CTCTGCATGCTTCAGTCA	GAGACGTACGAAGTCAGT
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	TTAAAGGTCCGCCTACGT	AATTTCCAGGCGGATGCA
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	TCAGTCGCAGTATGGCAA	TCAGTCGCAGTATGGCAA
<i>Actinomyces gerensceriae</i>	ACCCAGAAAGCCCGTT	TGGGGTCTTCGGGCAA
<i>S. anginosus/gordonii</i>	CAACTCACAGTCTATGGTGTAG	GTTGAGTGTGAGATACCACATC
<i>Streptococcus sanguinis</i>	CAATAATCAATTTTATGCGGT	GTTATTAGTTAAAATACGCCA
16S rRNA Universal	CTGCTGCCTCCCGTAGG	GACGACGGAGGCATCC

#### 4. 5. 4 Hibridização

Após fixação do ATN, as membranas foram lavadas durante 5 minutos em 2X SSC e posteriormente pré-hibridizadas a 42°C por 90 minutos numa solução de formamida 50%, 5 X SSC, caseína 1% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 5 X reagente de Denhardt (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 25 mM fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL RNA de levedura (Boehringer Mannheim) em volume final de 50ml. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “Miniblotter 45” (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às 45 canaletas do “Miniblotter”. Cada sonda na concentração inicial

de 4,5  $\mu\text{M}$ /  $\mu\text{L}$  foi diluída na solução de hibridização (UltraHyb™ Oligo hybridization Buffer- Ambion, Austin, TX, EUA) para obtenção de concentração final de 2 a 60  $\mu\text{M}$ , e estas adicionadas individualmente em cada canaleta do Miniblotter 45. O dispositivo foi colocado num envelope plástico vedado, seguindo-se hibridização a 42 °C por 90 minutos.

#### 4.5. 5 Detecção dos sinais

Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do “Miniblotter” e lavadas durante 1 hora em 250ml de solução estringente (2X SSC 0,5% SDS) a 37 °C para remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 5 minutos numa solução contendo 0,1M ácido maleico. Posteriormente, as membranas foram submetidas à lavagem em solução bloqueadora (270ml de 0,1 M ácido maleico e 30ml de caseína) durante 1 hora. Para detecção das sondas marcadas, a membrana foi depositada em solução contendo 50 ml de solução bloqueadora acrescida de 8  $\mu\text{l}$  de anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim) (Engler-Blum et al. 1993) durante 30 minutos. As membranas foram lavadas com uma solução de 0,1 M ácido maleico, 3 M NaCl, 0,2 M NaOH, 0,3% Tween 20, pH 8,0, 3X / 15 minutos, e 1X / 5 minutos em 200ml de uma solução contendo  $\text{MgCl}_2$  a 0,04% e 2,1 % dietanolamina (pH 9,5). Em seguida, as membranas foram incubadas com solução de detecção, CDP Star™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU), por 5 minutos a 37°C. Finalmente, as membranas foram colocadas num cassete sob um filme radiográfico (IBF-Medix, AGFA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por aproximadamente 40 minutos, e os filmes revelados logo em seguida. A Figura 1 apresenta os resultados de uma membrana do ROQT visualizada em filme radiográfico digitalizado.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo  $10^5$  e  $10^6$  bactérias. Para isto, o filme radiográfico foi digitalizado (HP-M1132, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente analisado pelo software TotalLab (Nonlinear Dynamics, Durham, USA) que tem a capacidade de medir a intensidade de pixels de cada sinal e compará-lo com os sinais controles.

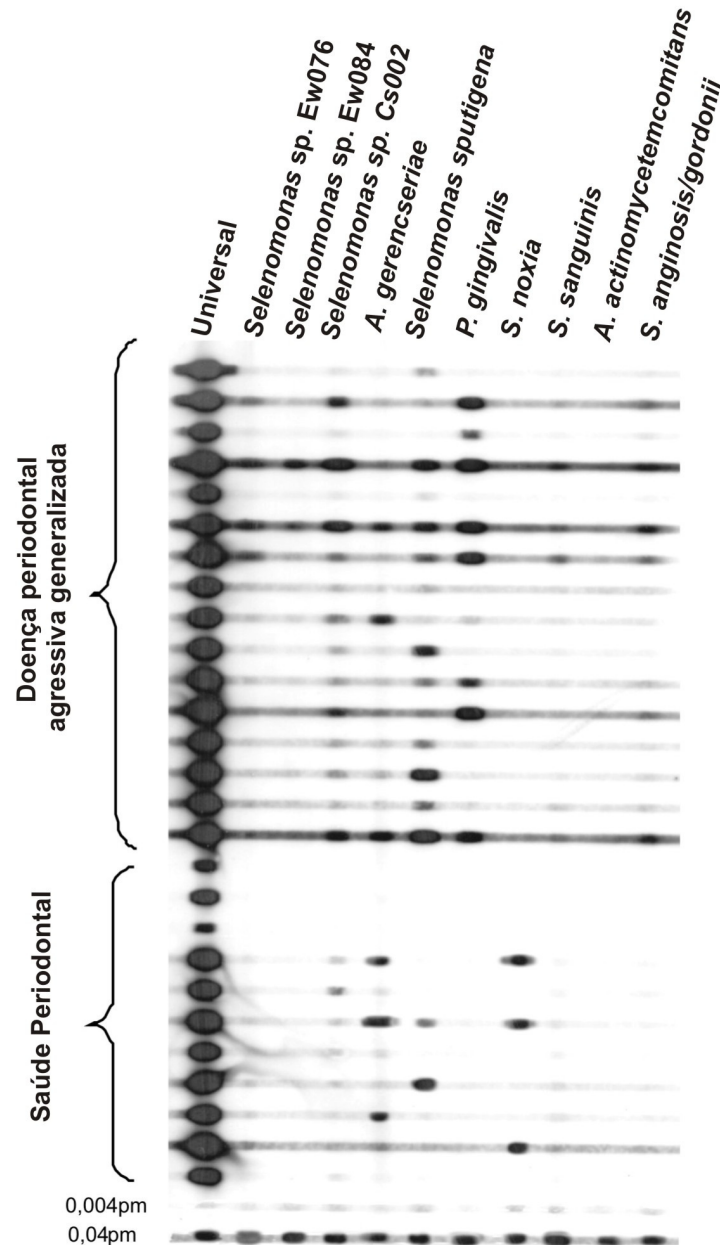


Figura 1. Foto ilustrativa do resultado de uma hibridização a técnica ROQT

## 4.6. Análise estatística

### 4.6.1. Monitoramento clínico

A média das medidas clínicas de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, assim com a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste de Mann–Whitney. O teste Qui-quadrado foi utilizado para a variável gênero. A significância estatística foi estabelecida em 5%.



#### *4.6.2. Monitoramento microbiológico*

Os dados microbiológicos foram expressos em nível médio de cada espécie em cada sítio. Estes níveis foram computados por indivíduo e depois dentro de cada grupo experimental. Diferenças nos níveis médios e no percentual de sítios colonizados dentro de cada grupo foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Diferenças existentes nos níveis médios entre diferentes categorias de PS no grupo PAG foram avaliadas pelo teste Wilcoxon. O teste Qui-quadrado foi utilizado para analisar as diferenças existentes na freqüência de indivíduos colonizados pelas espécies bacterianas avaliadas. A significância estatística foi estabelecida em 5%.

## 5. ARTIGO 1

Levels of *Selenomonas sputigena* and not-yet-cultivated *Selenomonas* species in subgingival biofilm of subjects with generalized aggressive periodontitis. (Segundo as normas da revista Oral Disease)

**Levels of *Selenomonas sputigena* and not-yet-cultivated *Selenomonas* species in subgingival biofilm of subjects with generalized aggressive periodontitis.**

Lucas F. H. Gonçalves<sup>1</sup>, Magda Feres<sup>1</sup>, Luciene C. Figueiredo<sup>1</sup>, Flavia R. P. Teles<sup>3</sup>, Marcia P. A. Mayer<sup>2</sup>, Marcelo Favero<sup>1,2</sup>

**Running head:** *Selenomonas* species in GAgP subjects.

1. Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, Guarulhos, SP, Brazil.
2. Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
3. Department of Periodontology, The Forsyth Institute, Cambridge, MA, USA

**Address for correspondence** (*fax number and e-mail can be published*)

Marcelo Favero  
Centro de Pós-Graduação e Pesquisa-CEPPE  
Universidade Guarulhos  
Praça Tereza Cristina, 229 Centro  
07023-070 Guarulhos, SP, Brazil  
e-mail: mfavero@prof.ung.br

## ABSTRACT

**Objectives:** To determine the levels of *Selenomonas sputigena* and not-yet-cultivated *Selenomonas* species in subgingival biofilm from subjects with generalized aggressive periodontitis (GAgP). **Methods:** Thirty systemically healthy subjects with periodontal health PH (n=15) and GAgP (n=15) underwent clinical and microbiological assessments. Nine subgingival plaque samples were collected from each subject and analyzed for 10 bacterial species, including cultivated and not-yet-cultivated taxa using RNA-oligonucleotide quantification technique. **Results:** Subjects with GAgP showed significantly higher mean counts of *P.gingivalis*, *S. sputigena* and *Selenomonas* sp. oral CS002, while *A. gerencseriae* and *S sanguinis* were found in higher mean counts in subjects with PH ( $p<0.01$ ). *Selenomonas* oral clone EW084 were only detected in the GAgP group. The levels of *P. gingivalis* and *S. sputigena* in GAgP group were elevated in sites with probing depth (PD)  $\geq 4$ mm in comparison with sites with PD  $\leq 3$ mm ( $p<0.01$ ). In addition, shallow pockets in subjects with GAgP showed higher mean counts of these two species compared with shallow pockets of PH subjects. These species and *Selenomonas* sp. oral EW076 showed a significantly positive correlation with increase of PD. **Conclusion:** In conclusion, higher levels of *S. sputigena* and *Selenomonas* sp. oral CS002 were found in GAgP subjects and their role in the pathogenesis of GAgP should be further investigated.

**Keywords:** *Selenomonas sputigena*, molecular biology, 16S rRNA, generalized aggressive periodontitis, not-yet-cultivated species

## INTRODUCTION

The accurate microbial diagnosis of an infectious disease is a critical step in order to establish effective therapeutic strategies. In the case of periodontal infections this is not a simple task, since disease onset and progression is not related merely to the presence of a specific microorganism, but most importantly, to the imbalance between levels and proportions of periodontal pathogens and beneficial species in different sites of the mouth (Socransky and Haffajee, 2005). The role of

oral microbiota in the etiology of periodontal diseases has been well established, and specificity may exist among certain bacterial species or groups and the various forms of periodontal disease (Albandar *et al*, 1997; Haraszthy *et al*, 2000; Kamma *et al*, 1999; Kamma *et al*, 1994; Melvin *et al*, 1994; Moore *et al*, 1985; Socransky *et al*, 1998). There are studies evaluating the microbiota associated with periodontal disease using different techniques, such as culture (Darwish *et al*, 1978; Tanner *et al*, 1979; Moore *et al*, 1982; Bonta *et al*, 1985; Moore *et al*, 1985; Kamma *et al*, 1995; Tinoco *et al*, 1997; Kamma *et al*, 1999), polymerase chain reaction (Darby *et al*, 2000; Haraszthy *et al*, 2000; Yang *et al*, 2004; Cortelli *et al*, 2005; Teixeira *et al*, 2009), Checkerboard DNA-DNA Hybridization (Socransky *et al*, 1998; Borges *et al*, 2009; Faveri *et al*, 2009, Teles *et al*, 2010), and available data have implicated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* as main periodontal pathogens (American Academy of Periodontology, 1996).

By using 16S cloning analysis methods, > 700 bacterial species have been detected in the oral cavity and only about 35% of oral bacteria have been cultivated (Chen *et al*, 2010; Dewhirst *et al*, 2010). This raises the interesting possibility that not-yet-cultivated and as-yet-uncharacterized species that have remained undetected may also participate in the etiology of oral diseases, including periodontal disease as well as be beneficial species. Faveri *et al*. (2008) analyzed the microbial diversity of ten subgingival biofilm samples from subjects with generalized aggressive periodontitis (GAgP) using 16S rRNA clonal analysis and found that species of *Selenomonas* dominated the diseased sites of these subjects. *Selenomonas sputigena* was the most frequently detected bacterial species. Other species of *Selenomonas* were often present in high levels, including *Selenomonas noxia*, *Selenomonas* oral clone EW076, *Selenomonas* oral clone EW084 and *Selenomonas* oral clone CS002. Actually, species of *Selenomonas* have been found in higher proportion in studies of the microbial diversity of the oral cavity (de Lillo *et al*, 2006; Kummar *et al*, 2005; Paster *et al*, 2001; Paster *et al*, 2002; Faveri *et al*, 2008; Olson *et al*, 2011). However, none of these microbial diversity studies has the ability to quantify the levels of multiple cultivate or not-yet-cultivated species in large number of individual biofilm sample simultaneously. Since, the absolute number and proportions of organisms in multiple individual biofilm samples are important in

distinguishing species associated with periodontal healthy of disease the truly role of *Selenomonas* species in periodontal disease is unknown.

Recently, Teles *et al.* (2011) developed the RNA-oligonucleotide quantification technique, which is a high throughput method with the ability to quantify not-yet-cultivated and cultivated taxa in large numbers of subgingival biofilm samples. Therefore, the purpose of the present study was to determine the levels of some *Selenomonas* species in subgingival biofilm samples from periodontally untreated subjects with GAgP by RNA-oligonucleotide quantification technique.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Subject population**

Thirty systemically healthy subjects were selected from the population referred to the periodontal clinic of Guarulhos University (Guarulhos, SP, Brazil). The medical and dental histories were obtained and a full-mouth periodontal examination was performed. Based on these data, the periodontal diagnosis was made, and subjects who fulfilled the inclusion/exclusion criteria were invited to participate in the study. The study protocol was explained to each subject, and a Signed Informed Consent was obtained. This study protocol was approved previously by Guarulhos University's Ethics Committee in Clinical Research.

### **Clinical examination**

The clinical examination was performed by one trained and calibrated examiner (Araujo et al, 2003). Visible plaque (0/1), gingival bleeding (0/1), bleeding on probing (BOP, 0/1), suppuration (0/1), probing depth (PD, mm) and clinical attachment level (CAL, mm) were measured at six sites per tooth (mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual and mesiolingual) in all teeth excluding third molars at the baseline visit. PD and CAL measurements were recorded to the nearest millimeter using a North Carolina periodontal probe (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

### **Inclusion criteria**

GAgP and PH were diagnosed based on the periodontal classification of the American Academy of Periodontology (Armitage 1999). Subjects had at least 20 teeth and needed to meet the following criteria in order to be included in this study:

#### *Generalized aggressive periodontitis (n=15)*

≤ 35 years of age; Minimum of six permanent incisors and/or first molars with at least one site each with PD and CAL ≥ 5 mm; Minimum of six teeth other than first molars and incisors with at least one site each with PD and CAL ≥ 5 mm; Familial aggregation (at least one other member of the family presenting or with history of periodontal disease) (Faveri et al. 2009).

#### *Periodontal Health (n=15)*

≤ 35 years of age; No sites with PD and CAL measurements > 3 mm and < 10% of sites exhibiting bleeding on probing and/or bleeding on probing.

### **Exclusion criteria**

Exclusion criteria were pregnancy, lactation, smoking, previous subgingival periodontal therapy, any systemic condition that could affect the progression of periodontal disease (e.g. diabetes and immunological disorders), long-term administration of anti-inflammatory medication, and antibiotic therapy in the previous 6 months.

### **Microbiological examination**

#### *Sample collection*

Individual subgingival plaque samples were collected from nine non-contiguous interproximal sites per subject. For GAgP group three sites with PD ≤ 3mm and six sites with PD ≥ 5mm were selected. Nine sites with PD ≤ 3mm were collected from PH group. The selected sites were randomized in different quadrants. After the clinical parameters had been recorded, the supragingival plaque was removed and the samples were taken with individual sterile Gracey curettes and immediately placed in separate polypropylene tubes containing 100 µl RNase-free TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6) and kept at -80 °C until extraction of total nucleic acids (TNA).

### **RNA-oligonucleotide quantification technique**

Counts of the 10 bacterial species (Table 1) were determined in each sample, using the RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) (Teles et al. 2011). The microbiological analysis was entirely performed at the Laboratory of Microbiology of Guarulhos University.

### **Extraction of total nucleic acids**

Extraction of TNA from all samples was performed using a Masterpure RNA & DNA purification kit (Epicentre, Madison, WI, USA). Cells were pelleted by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min. After the supernatant was discarded, the pellet contained in 25  $\mu$ l TE was resuspended by vortex mixing. One microliter of proteinase K (50  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup>) and 300  $\mu$ l of tissue and cell lysis buffer (provided by the manufacturer) were added and the solution was incubated in 65 °C waterbath for 15 min. After 5 min in ice, 175  $\mu$ l MCP protein precipitation reagent (provided by the manufacturer) was added to each sample. The debris was pelleted by centrifugation for 10 min. The supernatant was transferred to a new tube and 500  $\mu$ l isopropanol was added. Tubes were mixed by inversion for 2 min and TNA were pelleted by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4°C. After carefully pouring off the isopropanol, pellets were rinsed twice with 70% ethanol. Pellets were air dried for 10 min. One microliter of ScripGuard (Epicenter) was added to each sample and samples were kept at -80 °C until analysis.

### **Probe and standards preparation**

Oligonucleotide probes were prepared for 7 cultivated and 3 not-yet-cultivated bacterial taxa. The sequence were 18-22 nucleotides in length and had minimal secondary structure. Each sequence included in this group of probes targeted the 16S ribosomal DNA (*rRNA*) gene of the species or phlotypes listed in Table 1. The probe panel also included one universal (eubacterial) probe. This sequence was based on a conserved region of the bacterial 16S *rRNA* gene. All probe used in this study were based on sequences routinely employed in the Human Oral Microbial Identification Microarray (HOMIM)(Preza et al. 2009). One hundred picogram ( $\mu$ M) of each sequence were labeled using a digoxigenin 3'end labeling kit (Roche, Indianapolis, IN, USA). The standards for detection the oligonucleotide probes were a mixture of sequences complementary to the oligonucleotide probes (Table 1). The



'complementary' sequences were synthesized by Invitrogen (São Paulo, SP, Brazil). The final mixtures of standards had 0.004 or 0.04  $\mu\text{M}$  of each sequence. It was estimated that 0.004 and 0.04  $\mu\text{M}$  complementary probe sequence would approximate  $10^5$  and  $10^6$  bacterial cells, respectively.

### **Hybridization using oligonucleotide probe**

Ninety microliters of 2% glutaraldehyde (Ted Pella, Redding, CA, USA) and 910  $\mu\text{l}$  6 X SSC (1x SSC = 150mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0) were added to each sample as well into the standards. The final solutions were deposited in individual lane of a Minislot (Immunitics, Cambridge, MA) concentrated onto a nylon membrane (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) and fixed to the membrane by baking it at 120<sup>o</sup> C for 20 min. Before hybridization, the membranes were pre-wetted in 2 x SSC. The membranes were pre-hybridized in 35ml of a solution containing 50% formamide, 5 x SSC, 1% casein (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), 5x Denhardt's reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA), 25mM sodium phosphate (pH=6.5) and 0.5mg ml<sup>-1</sup> yeast RNA (Boehringer Mann-haim). The solution was placed into a plastic hybridization bag containing the membrane. The sealed bag was incubated at 42<sup>o</sup>C for at least 90 min. Each membrane with fixed TNA was placed in a Miniblotter 45 (Immunitics), with the "lanes" of TNA at 90<sup>o</sup> to the channels of the device. A 30 x 45 "checkerboard" pattern was produced.

Probes were diluted in a proprietary hybridization buffer (UltraHyb Oligo buffer; Ambion, Austin, TX, USA). The final concentration of the different probes in each lane in the Miniblotter 45 varied from 2 to 40  $\mu\text{M}$ . The digoxigenin-labeled oligonucleotide probes, diluted in UltraHyb Oligo buffer, were placed in individual lanes of the Miniblotter. Empty lanes were filled with hybridization solution. The apparatus was placed in a plastic bag and the membranes were hybridized at 42<sup>o</sup>C for 80 min. Membrane were washed on a rotor with 250 ml sterile 2 x SSC, 0.5% sodium dodecyl sulfate at 37<sup>o</sup>C for 60 min. To detect hybrids, membranes were blocked in a maleic acid buffer containing 10% casein and then incubated with a 1:2500 dilution of anti-digoxigenin antibody conjugated with alkaline phosphate (Roche). The membrane and the solution were placed in a sealed hybridization bag and kept on a rotator for 30 min. The membranes were rinsed with maleic acid buffer

for 5 min to remove excess antibody and then washed three times with that buffer for 15min each time. The membranes were washed with 200ml 'buffer 3' [0.04% MgCl<sub>2</sub> and 2.1 diethanolamine (pH 9.5), equal volumes] for 5 min. Finally, 1 ml of a chemiluminescent substrate (CDP Star; Tropix, Bedford, MA, USA) was diluted in 4 ml of 'buffer 3'. The final solution was deposited onto the membrane surface. The membrane was exposed to an X-ray film (IBF-Medix, AGFA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) in a radiograph cassette for 60 min. The films were scanned and signal intensities of the samples and the standards were measured using TotalLab software (NonLinear USA, Durham, NC). Signals were converted to absolute "counts" by comparison with standards on the membrane. Failure to detect a signal was recorded as zero. The 'counts' were computed by estimation that 0.04  $\mu\text{M}$  of target sequences in the standard was equivalent to approximately  $10^6$  cells and that 0.004  $\mu\text{M}$  target sequences approximated  $10^5$  cells. Absence of signal detection was recorded as zero.

### **Statistical analysis**

The mean age and the mean percentage of sites with visible plaque, gingival bleeding, BOP and suppuration, as well as mean PD and CAL were computed for each subject and then averaged across subjects in both groups. Mean estimated 'counts' ( $\times 10^5$ ) of individual bacterial species were averaged within each subject and then across subjects in both groups. Prevalence was computed by determining the percentage of sites per subject colonized by each species at level  $\geq 10^5$  and then averaging across subjects in the two groups. The significance of differences between the two groups for age and the clinical and microbiological parameters was sought using the Mann–Whitney U-test. The Wilcoxon test was used to detect statistically significant differences within PD categories in GAgP group. Chi-square test was employed to compare the differences in the frequency of gender and prevalence of subjects colonized by bacterial species. The level of significance was set at 5%.

## RESULTS

### Clinical findings

The demographic characteristics and clinical parameters of the studied population are presented in Table 2. A total of fifteen subjects with PH (n=15) and fifteen with GAgP (n=15) participated in this investigation. No statistically significant differences were observed between groups for age and gender. The GAgP group displayed significantly higher means ( $p < 0.05$ ) for all the clinical measurements compared with the control group.

### Microbiological findings

Table 3 presents the mean estimated 'counts' ( $\times 10^5$ ) of the 10 species evaluated in the subgingival plaque samples from the PH and GAgP groups. Subjects with GAgP showed higher mean counts of *P.gingivalis*, *S. sputigena* and *Selenomonas* sp. CS002. *Selenomonas* sp. EW084 could only be detected in the GAgP group. *A. gerencseriae* and *S. sanguinis* presented significantly higher mean counts in subjects with PH ( $p < 0.01$ ).

The mean estimated 'counts' of the bacterial species in the different PD categories ( $\leq 3$ mm and  $\geq 5$ mm) in subjects with GAgP are present in Table 4. *P. gingivalis* and *S. sputigena* showed significant higher mean counts in sites with PD  $\geq 5$ mm compared with PD  $\leq 3$ mm. In addition, shallow pockets and deep pockets in subjects with GAgP showed higher mean counts of these two species compared with shallow pockets of PH subjects (Figure 1).

The percentage of sites colonized by the 10 species/phylotypes evaluated in subgingival plaque samples taken from subjects with GAgP and PH are presented in Table 5. Subjects with GAgP showed higher mean percentage of sites colonized by *S. sputigena*, *Selenomonas* sp. CS002 and *P.gingivalis* in comparison with PH group ( $p < 0.05$ ). No differences in the prevalence of subjects colonized by all the species analyzed were observed between groups, except for *P.gingivalis* which was more prevalent in subjects with GAgP (Table 6,  $p < 0.05$ ). Spearman correlations between bacterial species and PD are presented in Table 7. *P. gingivalis*, *S. sputigena* and *Selenomonas* sp. EW076 were positively correlated with the increase of PD.

## DISCUSSION

Previous studies using the *16S rRNA* cloning and sequencing strategy had shown that species of *Selenomonas* are presented in greater proportion in the subgingival biofilm of subjects with chronic (Paster *et al*, 2001; de Lillo *et al*, 2006; Olson *et al*, 2011) and aggressive periodontitis (Faveri *et al*, 2008), as well as in endodontic infections (Rolph *et al*, 2001). However, studies that used this methodology normally analyzed low number of sites and subjects (Paster *et al*, 2001, Faveri *et al*, 2008). In addition, the use of “universal” PCR primers can introduce biases into the analysis of the species composition of clone libraries because of mismatches between the primer and target organism sequences (de Lillo *et al*, 2006). Therefore, the association between species of *Selenomonas* and periodontal disease are unclear. Thus, the main goal of the present study was to determine the levels of some *Selenomonas* species, including not-yet cultivated species of *Selenomonas*, in the subgingival biofilm from subjects with generalized aggressive periodontitis.

The present study investigated the presence and relative levels of 10 bacterial taxa in subgingival biofilm of subjects with GAgP by using a RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) (Teles *et al*, 2011). This approach has some important advantages over other molecular biology techniques, such as Checkerboard DNA-DNA hybridization, real time PCR and *16S rRNA* cloning analysis. ROQT represent a ‘more sensitive checkerboard’ which allow the quantification of both cultivable and not-yet-cultivated bacterial taxa. In addition, this methodology differs in the nature of the probes, their target molecules, their hybridization protocols and the nature of the species sought (Teles *et al*, 2011). The strengths of the proposed method include the absence of pooling, amplification or dilution bias, because an entire individual sample is laid onto the membrane. In the present study, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *S. sanguinis* and *A. gerencseriae* were used as control for pathogenic and host-beneficial species. In agreement with previous studies (Socransky *et al*, 1998; Haffajee and Socransky 2005; Socransky and Haffajee 2005; Stingu *et al*, 2008; Faveri *et al*, 2009; da Silva-Boghossian *et al*, 2011) *P.gingivalis* was found in significantly higher levels, as well as in higher prevalence in subjects with GAgP compared with PH group, while *S.*

*sanguinis* and *A. gerencseriae* were found in significantly higher levels in PH subjects compared with GAgP group.

Overall, the results of the present study reinforce the association of *S. sputigena* with the etiology of GAgP. This species was found in significantly higher levels and prevalence (% of sites colonized) in subjects with GAgP than PH group ( $p < 0.01$ ), as well as in higher levels in deep site compared with shallow sites in GAgP subjects. In addition, the levels of *S. sputigena* presented a significantly positive correlation with the increase of PD. *S. sputigena* is a Gram-negative, multiflagellated, motile, anaerobic rod (Kolebrander *et al*, 1989) and has been previously associated with necrotizing ulcerative periodontitis (Gmur *et al*, 2004), aggressive periodontitis (Kamma *et al*, 1995), active periodontitis lesions (Haffajee *et al*, 1984; Tanner *et al*, 1998) and GAgP (Faveri *et al*, 2008). Faveri *et al*. (2008) using 16S rRNA cloning analysis showed that species of *Selenomonas* dominated diseased sites of subjects with GAgP and *S. sputigena* was the most frequently-detected bacterial species, present in 9 of ten subjects, often at high levels of about 20% of the total bacterial population. Previous studies, using other methodological approaches, also identified this species as a dominant member of the microbiota of the periodontal pocket in subjects with periodontitis (Moore *et al*, 1982; Moore *et al*, 1984; Dzink *et al*, 1985; Dzink *et al*, 1988). In addition, Kumar *et al*. (2003) have also reported higher prevalence of *S. sputigena* in subject with chronic periodontitis. However, few studies analyzed the virulence factors of *S. sputigena*, mainly because the isolation of this species from dental plaque is difficult due to their strictly anaerobic characteristics and time-consuming. Socransky *et al*. (1982) reported that subjects with periodontal disease showed high titer of antibody against *S. sputigena*. In addition, Socransky. (1977) observed a bone resorption activity of *S. sputigena* in germ-free rats. To the best of our knowledge, lipopolysaccharide and lipid A of *S. sputigena* were the only virulence factor described for this species (Kumada *et al*, 1997). Kumada *et al*. (1997) reported that these two molecules induced IL-1 $\alpha$  and IL-6 in murine macrophages. In addition, using gel chromatography the authors reported that structure of lipid A from *S. sputigena* is different from that generally found in lipid A of other Gram-negative bacteria. The authors suggested that lipopolysaccharide, as well as lipid A of *S. sputigena*, has the potential to cause periodontal inflammation leading to advanced destructive periodontal disease by activation the cytokine network of the human immune system.

Previous studies have investigated not-yet-cultivated species (Paster *et al*, 2001; Kumar *et al*, 2005; Li *et al*, 2006). Kumar *et al*. (2005) evaluated the subgingival microbiota of periodontal health and disease. The authors described that the most abundant species belonged to the genera *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Campylobacter* and *Peptostreptococcus*. In the present study, we analyzed three not-yet-cultivated *Selenomonas* species. Although in low levels and prevalence, all not-yet-cultivated taxa were detected in GAgP subjects. *Selenomonas* sp. EW084 was only detected in GAgP subjects, as well as *Selenomonas* sp. CS002 was presented in higher levels and prevalence in these subjects. Preza *et al*. (2008) showed that the phylotype *Selenomonas* sp. CS002 showed a strikingly high prevalence and the highest concentration in the carious samples. In addition, *Selenomonas* sp. EW076 presented a positive correlation with the increase of PD (Table 5). However, longitudinal studies should be designed in order to elucidate the role of this species in the etiology of periodontal disease.

## **CONCLUSION**

In conclusion, *S. sputigena* and *Selenomonas* sp. CS002 were detected in higher levels and prevalence in subgingival biofilm of subjects with GAgP and their role in pathogenesis of periodontitis should be further investigated.

## **Acknowledgements**

This study was supported by Research Grants 2005/59443-2 and 2009/12358-1 from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil).

Table 1. Oligonucleotide probes and controls of the species/phylotypes evaluated.

Species/phylotypes	Sequence (5'-3')	Control (5'-3')
<i>Selenomonas sputigena</i>	CCGTCACCCAAACTCAAT	GGCAGTGGGTTTGAGTTA
<i>Selenomonas noxia</i>	CTATTCGCATTAGGCACG	GATAAGCGTAATCCGTGC
<i>Selenomonas sp. EW084</i>	CCGTCATTACAGAGCACT	GGCAGTAATGTCTCGTGA
<i>Selenomonas sp. EW076</i>	CTCTGCATGCTTCAGTCA	GAGACGTACGAAGTCAGT
<i>Selenomonas sp. CS002</i>	CTCTGCATGCTTCAGTCA	GAGACGTACGAAGTCAGT
<i>A.actinomycescomitans</i>	TTAAAGGTCCGCCTACGT	AATTTCCAGGCGGATGCA
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	TCAGTCGCAGTATGGCAA	TCAGTCGCAGTATGGCAA
<i>Actinomyces gerensceriae</i>	ACCCAGAAAGCCCGTT	TGGGGTCTTCGGGCAA
<i>S. anginosus/gordonii</i>	CAACTCACAGTCTATGGTGTAG	GTTGAGTGTGAGATACCACATC
<i>Streptococcus sanguinis</i>	CAATAATCAATTTTATGCGGT	GTTATTAGTTAAATACGCCA
16S rRNA Universal	CTGCTGCCTCCCGTAGG	GACGACGGAGGCATCC

A subset of the probes employed were 'combination probes', in that they could not distinguish species/phylotypes. This was the case for *S. anginosus/gordonii*.

Table 2. Demographic characteristics and mean ( $\pm$  SD) full-mouth clinical parameters in both groups.

Clinical variables	PH (n=15)	GAgP (n=15)
Age <sup>NS</sup>	26.6 $\pm$ 3.6	27.4 $\pm$ 4.3
Gender (M/F) <sup>NS</sup>	9/6	8/7
Probing depth (mm)*	1.96 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 0.8
Clinical Attachment level (mm)*	1.04 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 1.2
Percentage of sites with		
Plaque accumulation*	34.5 $\pm$ 9.9	74.1 $\pm$ 10.4
Gingival bleeding*	4.5 $\pm$ 2.9	24.2 $\pm$ 10.9
Bleeding on probing*	6.1 $\pm$ 3.2	74.1 $\pm$ 15.7
Suppuration*	0.0 $\pm$ 0.0	4.5 $\pm$ 6.2
PD $\leq$ 3 mm*	100	37.3 $\pm$ 20.1
PD 4-6 mm*	0	39.9 $\pm$ 28.2
PD $\geq$ 7 mm*	0	22.8 $\pm$ 15.7

PH, periodontal health; GAgP, generalized aggressive periodontitis; \*p<0.05; Mann-Whitney test; NS, not significant (p>0.05); PD, probing depth; SD, standard deviation.

Table 3. Mean estimated 'counts' ( $\times 10^5 \pm \text{SD}$ ) of 10 bacterial taxa in subgingival biofilm samples obtained from subjects with generalized aggressive periodontitis and subjects with periodontal health.

Species/phylotypes	Experimental groups		*p-value
	PH (n=15)	GAgP (n=15)	
<i>S. sputigena</i>	0.3 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 2.9	0.001
<i>S. noxia</i>	0.2 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 2.0	NS
<i>Selenomonas sp. EW084</i>	0	0.1 $\pm$ 0.4	NS
<i>Selenomonas sp. EW076</i>	0.05 $\pm$ 0.9	0.5 $\pm$ 1,0	NS
<i>Selenomonas sp. CS002</i>	0.01 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.09	0.01
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.06 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.4	NS
<i>P. gingivalis</i>	0.1 $\pm$ 0.3	7.8 $\pm$ 3.9	0.001
<i>A. gerecseriae</i>	1.7 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.4	0.001
<i>S. anginosus/gordonii</i>	1.3 $\pm$ 1,0	1.4 $\pm$ 1.8	NS
<i>S. sanguinis</i>	1.3 $\pm$ 1.5	0.3 $\pm$ 0.01	0.01

\*p<0.05; Mann-Whitney test; PH, periodontal health; GAgP, generalized aggressive periodontitis; NS, not significant; PD, probing depth; SD, standard deviation.

Table 4. Mean estimated 'counts' ( $\times 10^5 \pm \text{SD}$ ) of 10 bacterial taxa in subgingival biofilm samples obtained baseline PD $\leq$ 3mm and PD $\geq$ 5mm at subjects with generalized aggressive periodontitis.

Species/phylotypes	GAgP		*p-value
	PD $\leq$ 3mm	PD $\geq$ 5mm	
<i>S. sputigena</i>	1.7 $\pm$ 1.7	6.7 $\pm$ 5.5	0.027
<i>S. noxia</i>	0.6 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 1.1	NS
<i>S. oral clone EW084</i>	0.01 $\pm$ 0.01	0.3 $\pm$ 0.8	NS
<i>S. oral clone EW076</i>	0.04 $\pm$ 0.09	1.2 $\pm$ 2.9	NS
<i>S. oral clone CS002</i>	0.08 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.05	NS
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.01 $\pm$ 0.04	0.3 $\pm$ 0.8	NS
<i>P. gingivalis</i>	2.4 $\pm$ 2.7	12.2 $\pm$ 6.1	0.001
<i>A. gerecseriae</i>	0.2 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.8	NS
<i>S. anginosus/gordonii</i>	1.4 $\pm$ 2.8	1.4 $\pm$ 1.8	NS
<i>S. sanguinis</i>	0.5 $\pm$ 0.09	0.1 $\pm$ 0.02	NS

\*p<0.05; Wilcoxon test; GAgP, generalized aggressive periodontitis; NS, not significant; PD, probing depth; SD, standard deviation.



Table 5. Percentage of sites colonized by 10 bacterial taxa at levels  $\geq 10^5$  in subgingival plaque samples taken from subjects with generalized aggressive periodontitis and subjects with periodontal health.

Species/phylotypes	Experimental groups		*p-value
	PH (n=15)	GAgP (n=15)	
<i>S. sputigena</i>	15.4 ± 18.9	51.4 ± 32.7	0.005
<i>S. noxia</i>	12.4 ± 19.4	27.8 ± 28.4	NS
<i>Selenomonas sp. EW084</i>	0	7.3 ± 10.7	NS
<i>Selenomonas sp. EW076</i>	2.9 ± 8.0	15.4 ± 13.7	NS
<i>Selenomonas sp. CS002</i>	6.1 ± 5.7	22.1 ± 11.9	0.41
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3.6 ± 6.7	13.9 ± 16.8	NS
<i>P. gingivalis</i>	4.4 ± 8.1	65.5 ± 30.9	0.001
<i>A. gerecseriae</i>	38.2 ± 29.6	22.9 ± 15.0	NS
<i>S. anginosus/gordonii</i>	41.8 ± 30.4	27.8 ± 28.4	NS
<i>S. sanguinis</i>	27.9 ± 29.2	24.9 ± 26.1	NS

\*p<0.05; Mann-Whitney test; PH, periodontal health; GAgP, generalized aggressive periodontitis; NS, not significant; PD, probing depth; SD, standard deviation.

Table 6. Prevalence (%) and number of subjects colonized by bacterial species in subjects with generalized aggressive periodontitis and subjects with periodontal health.

Species/phylotypes	Experimental groups		†p-value
	PH (n=15)	GAgP (n=15)	
<i>S. sputigena</i>	60 (9)	80 (12)	NS
<i>S. noxia</i>	40 (6)	67 (10)	NS
<i>Selenomonas sp. EW084</i>	0	40 (6)	NS
<i>Selenomonas sp. EW076</i>	26 (4)	53 (8)	NS
<i>Selenomonas sp. CS002</i>	33 (5)	67 (10)	NS
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	20 (3)	46 (7)	NS
<i>P. gingivalis</i>	26 (4)	93.3 (14)	0.003
<i>A. gerecseriae</i>	73 (11)	46 (7)	NS
<i>S. anginosus/gordonii</i>	80 (12)	66 (10)	NS
<i>S. sanguinis</i>	66 (10)	60 (9)	NS

Subjects in which a given specie/phylotype was detected in at least on sample, were considered carriers of that particular microorganism. Percentages were determined based on the total number of subjects in each clinical group. †p<0.05; Chi-square test

Table 7. Spearman' correlation between mean estimated 'counts' of *P.gingivalis*, *S. sputigena* and *Selenomonas* sp. EW076 with increase of probing depth.

Species/phylotypes	PD	
	r	p-value
<i>P. gingivalis</i>	0.77	0.0001
<i>S. sputigena</i>	0.60	0.009
<i>Selenomonas</i> sp. EW076	0.42	0.031

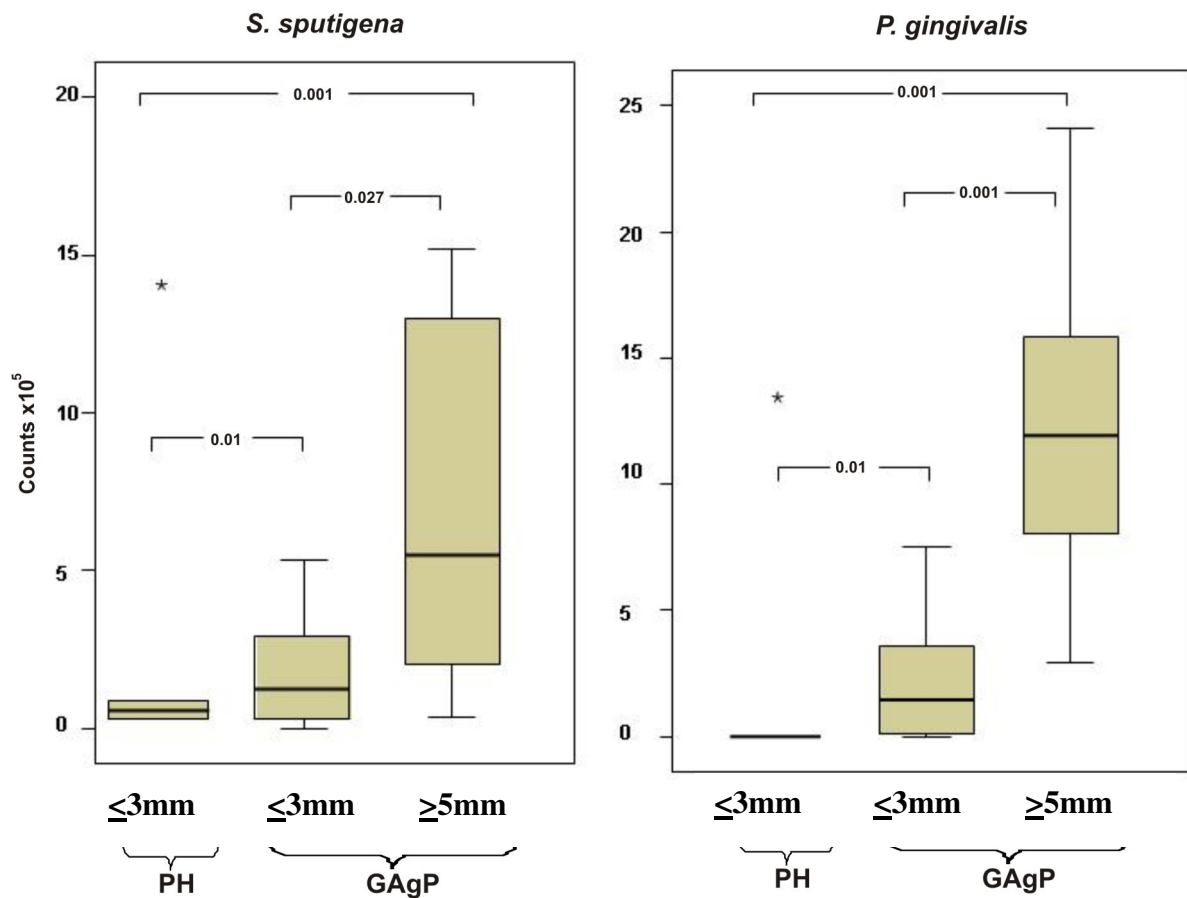


Figure 1. Mean estimated 'counts' ( $\times 10^5$ ) of *S. sputigena* and *P. gingivalis* in the PH subjects and in sites with PD  $\leq 3$ mm and PD  $\geq 4$ mm in the GAgP group. Boxplots show the median, minimum, and maximum values. The significance of differences between groups was assessed using Mann-Whitney and Wilcoxon test. The star (\*) represent extreme outliers. PH, periodontal health; GAgP, generalized aggressive periodontitis;

## REFERENCES

- Albandar JM, Brown LJ, L oe H (1997). Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 68:973-81.
- American Academy of Periodontology. (1996) Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and micro- bial factors. *Ann Periodontol* 1: 926–32.
- Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M (2003). Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol.* 74:1736-40.
- Armitage GC (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 4:1-6.
- Bonta Y, Zambon JJ, Genco RJ, Neiders ME (1985). Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival plaque: comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res.* 64:793-8.
- Borges MA, Figueiredo LC, Brito RB Jr, Faveri M, Feres M (2009). Microbiological composition associated with vitamin D receptor gene polymorphism in chronic periodontitis. *Braz Oral Res.* 23:203-8.
- Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE (2010). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford).* Jul 6;baq013. Print 2010.
- Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ (2005). Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 32:860-6.
- Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF (2000). Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol.* 27:417-24.
- da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP (2011). Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol.* 2011 Mar 11.
- Darwish S, Hyppa T, Socransky SS (1978). Studies of the predominant cultivable microbiota of early periodontitis. *J Periodontal Res.* 13:1-16
- de Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG (2006). Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol.* 21:61-8

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG (2010). The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 192:5002.

Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS (1985). Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 12:648-59.

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD (1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 15:316-23.

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

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

Gmür R, Wyss C, Xue Y, Thurnheer T, Guggenheim B (2004). Gingival crevice microbiota from Chinese patients with gingivitis or necrotizing ulcerative gingivitis. *Eur J Oral Sci.* 112:33-41.

Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL, Smith DJ (1984). Clinical, microbiological and immunological features associated with the treatment of active periodontosis lesions. *J Clin Periodontol.* 11:600-18.

Haffajee AD, Socransky SS (2005). Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000.* 2005;38:9-12.

Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM et al (2000). Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol* 71: 912–22.

Kamma JJ, Nakou M, Manti FA (1994). Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J Periodontol* 65: 1073– 78.

Kamma JJ, Nakou M, Manti FA (1995). Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontal Res.* 30:66-72.

Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC (1999). Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J Periodontal Res.*34:25-33.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV (1989). Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect Immun.* 57:3194-203.

Kumada H, Watanabe K, Nakamu A, Haishima Y, Kondo S, Hisatsune K, Umemoto T (1997). Chemical and biological properties of lipopolysaccharide from *Selenomonas sputigena* ATCC 33150. *Oral Microbiol Immunol.* 12:162-7.

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

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

Li CL, Liang JP, Jiang YT (2006). Association of uncultivated oral phylotypes AU126 and X112 with periodontitis. *Oral Dis.* 12:371-4.

Melvin WL, Assad DA, Miller GA, Gher ME, Simonson L, York AK (1994). Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodontitis. *J Periodontol.* 65:576-82.

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

Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Good IJ, Smith EP, Ranney RR, Palcanis KG (1984). Variation in periodontal floras. *Infect Immun.* 46:720-6

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

Olson JC, Cuff CF, Lukomski S, Lukomska E, Canizales Y, Wu B, Crout RJ, Thomas JG, McNeil DW, Weyant RJ, Marazita ML, Paster BJ, Elliott T (2011). Use of 16S ribosomal RNA gene analyses to characterize the bacterial signature associated with poor oral health in West Virginia. *BMC Oral Health.* 11:7.

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

Paster BJ, Russell MK, Alpagot T, Lee AM, Boches SK, Galvin JL, Dewhirst FE (2002). Bacterial diversity in necrotizing ulcerative periodontitis in HIV-positive subjects. *Ann Periodontol.* 7:8-16.

Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ (2008). Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol.* 46:2015-21.

Preza D, Olsen I, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ (2009). Diversity and site-specificity of the oral microflora in the elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 28:1033-40.

- Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J (2001). Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 39:3282-9.
- Socransky SS.(1977). Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. *J Periodontol.* 48:497-504.
- Socransky SS, Tanner AC, Goodson JM, Haffajee AD, Walker CB, Ebersole JL, Sornberger GC (1982). An approach to the definition of periodontal disease syndromes by cluster analysis. *J Clin Periodontol.* 9:460-71.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 25:134-44.
- Socransky SS, Haffajee AD (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 38:135-87.
- Stingu CS, Eschrich K, Rodloff AC, Schaumann R, Jentsch H (2008). Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *J Med Microbiol.*57:495-9.
- Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS (1979). A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol.* 6:278-307.
- Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL Jr (1998). Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *Clin Periodontol.*25:85-98.
- Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MR, Mayer MP (2009). Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 36:482-7.
- Teles RP, Gursky LC, Faveri M, Rosa EA, Teles FR, Feres M, Socransky SS, Haffajee AD (2010). Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 37:313-23.
- Teles FR, Teles RP, Siegelin Y, Paster B, Haffajee AD, Socransky SS (2011). RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) for the enumeration of uncultivated bacterial species in subgingival biofilms. *Mol Oral Microbiol.* 26:127-39.
- Tinoco EM, Lyngstadaas SP, Preus HR, Gjermo P (1997). Attachment loss and serum antibody levels against autologous and reference strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in untreated localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 24:937-44.

Yang HW, Huang YF, Chou MY (2004). Occurrence of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol.* 75:1077-83.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos pontos positivos do presente estudo foi padronizar e utilizar uma nova técnica de biologia molecular que tem a capacidade de estimar os níveis de espécies cultivadas e ainda não cultivadas em um grande número de amostras. Em um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa observamos que espécies de *Selenomonas*, especialmente *S. sputigena*, estavam presentes em proporções elevadas no ambiente subgingival de indivíduos com PAG. Entretanto, o baixo número de amostras avaliadas associado aos vieses da técnica de clonagem e sequenciamento levantam questionamentos sobre estes resultados. Desta forma, o presente estudo avaliou em um maior número de amostras (n= 270) de biofilme subgingival de indivíduos com S e PAG, os níveis de *S. sputigena* e de espécies de *Selenomonas* ainda não cultivadas. Os dados do presente estudo sugerem que além do patógeno periodontal clássico *P. gingivalis*, outras espécies, tais como *S. sputigena* e *Selenomonas* sp. CS002 podem estar envolvidas com a etiologia da PAG. Entretanto, fazem-se necessário novos estudos que tenham como objetivo avaliar as alterações microbiológicas ocorridas por estas espécies após o tratamento periodontal para desta forma elucidar ainda mais o papel destas espécies nas doenças periodontais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

American Academy of Periodontology. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and micro- bial factors. *Ann Periodontol.* 1996;1: 926–32.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int. Dent. J.* 1975; 25:229-35.

Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol.* 2003;74:1736-40.

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

Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2004;34:9-21.

Bonnet R, Suau A, Doré J, Gibson GR, Collins MD. Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52:757-63.

Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford).* 2010; baq013.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Rosalém W, Mendes MC, Souto RM, Uzeda M. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol.* 2005; 76:778-84.

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

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192:5002.

Drescher J, Schlafer S, Schaudinn C, Riep B, Neumann K, Friedmann A, Petrich A, Göbel UB, Moter A. Molecular epidemiology and spatial distribution of *Selenomonas* spp. in subgingival biofilms. *Eur J Oral Sci.* 2010;118:466-74.

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.

Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL. Survival analysis of periodontal sites before and after periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 1985;12:553-67.

Haffajee AD, Socransky SS, Dzink JL, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1988;15:240-6.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1997;24:324-34.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000*. 2005;38:9-12.

Kisby LE, Savitt ED, French CK, Peros WJ. DNA probe detection of key periodontal pathogens in juveniles. *J Pedod*. 1989;13:222-9.

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;43:3944-55.

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.

Lang N, Barthold PM, Culliman M et al. Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4: 53.

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

Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Løe H. Oral health of United States adults. The National Survey of Oral Health in U.S. employed adults and seniors: 1985-1986 national findings. NIH Publication no.87-2868. Bethesda, MD:NIDR, 1987.

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, Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol 2000*. 2009;51:38-44.

Preza D, Olsen I, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Diversity and site-specificity of the oral microflora in the elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28:1033-40.

Pilot T, Miyazaki H. Periodontal conditions in Europe. *J Clin Periodontol*, 1991; 18:353-57.

Sakamoto M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Comparison of the oral bacterial flora in saliva from a healthy subject and two periodontitis patients by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *Microbiol Immunol*. 2000;44:643-52.

Scupham AJ, Jones JA, Wesley IV. Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. *J Appl Microbiol*. 2007;102:401-9.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*. 1994;17:788-92

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

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005;38:135-87.

Slots J, Dahlén G. Subgingival microorganisms and bacterial virulence factors in periodontitis. *Scand J Dent Res*. 1985;93:119-27.

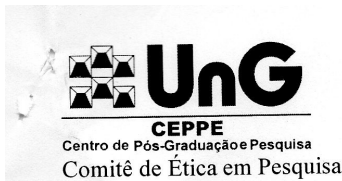
Tal M. Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek. *J Periodontol*. 1980;51:668-9.

Teles FR, Teles RP, Siegelin Y, Paster B, Haffajee AD, Socransky SS. RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) for the enumeration of uncultivated bacterial species in subgingival biofilms. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26:127-39.

Tonetti MS, Mobeli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4:39-53.

Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD, Abee T, de Vos WM. DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol*. 2001;24:405-10.

## ANEXO A:



Guarulhos, 14 de outubro de 2009.

Exmo. Sr.  
Marcelo de Faveri

Referência: **Aprovação de Projeto**  
**SISNEP/510** - "Novas espécies bacterianas associadas com a periodontite"

**PARECER Nº 197/2009**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Novas espécies bacterianas associadas com periodontite crônica" - SISNEP/510, na reunião de 13.10.2009, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o projeto acima **aprovado**.

As orientações abaixo devem ser consideradas pelo Pesquisador Responsável durante a realização da pesquisa, visando que a mesma se desenvolva respeitando os padrões éticos:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclarecemos a necessidade da apresentação de relatório final até **15.12.11**.

Jumara Silvia Van De Velde Vieira  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Coordenadora