



MESTRADO EM ODONTOLOGIA
Área de Concentração em Periodontia

MARCELO DE PAIVA RAFFAELLI

**ANALISE DO PERFIL DE SIMILARIDADE DA
MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS
COM PERIODONTÍTE**

**Guarulhos
2009**

MARCELO DE PAIVA RAFFAELLI

**ANALISE DO PERFIL DE SIMILARIDADE DA
MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS
COM PERIODONTÍTE**

**Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos
para Obtenção do Título de Mestre em Odontologia
Área de concentração: Periodontia
Orientadora: Profa. Dra. Luciene C. de Figueiredo
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri**

**Guarulhos
2009**

R136a Raffaelli, Marcelo De Paiva
Análise do perfil de similaridade da microbiota subgengival de indivíduos com periodontite/ Marcelo De Paiva Raffaelli. Guarulhos, SP, 2009.

51 f. ; 31 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Periodontia) - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2009.

Orientador: Prof. Dr^a. Dra. Luciene C. de Figueiredo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Dr. Marcelo de Faveri

Bibliografia: f. 45 - 51

1. Microbiota subgengival. 2. Doença Periodontal. 3. Periodontia. 4. Microrganismos. 5. Odontologia I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 22st 617.632



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "PERFIL DE SIMILARIDADE DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM DOENÇA PERIODONTAL" em sessão pública realizada em 29 de Abril de 2009, considerou o candidato Marcelo de Paiva Raffaelli aprovado com louvor.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo (UnG)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'L. Figueiredo', written over a horizontal line.

2. Profa. Dra. Susana d'Avila (ADOCI)

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Susana d'Avila', written over a horizontal line.

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Poliana Mendes Duarte', written over a horizontal line.

Guarulhos, 29 de Abril de 2009.

Dedico este trabalho aos meus pais, Bruno Raffaelli Junior e Vânia de Paiva Raffaelli, que durante toda a minha vida foram exemplo de força, perseverança e união. Mostraram-me que a vida é feita de conquistas diárias.

Ao meu irmão, Maurício de Paiva Raffaelli, que mesmo sem tempo para longos encontros esteve ao meu lado me incentivando a prosseguir.

À minha esposa Renata Rocchi Moran que de forma compreensiva respeitou meus limites e meu cansaço. E esteve ao meu lado por toda essa jornada, sempre levando carinho e amor.

Às minhas filhas Julia Rocchi Moran e Bruna Moran Raffaelli que me ajudaram a ver que a alegria é a chave para sermos fortes e continuar na batalha.

"As informações que temos não é a que desejamos. A informação que desejamos não é a que precisamos. A informação que precisamos não está disponível."

John Peers

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

Agradecimentos Especiais

A Deus, pelo dom da vida e, pois sem ele não teria chegado ao fim de mais uma etapa. Agradeço às bênçãos de todos os dias.

À minha orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Luciene C. Figueiredo, pela orientação deste trabalho, ensinamentos científicos e pessoais que absorvi desde o início de nossa jornada juntos. Obrigado por toda ajuda e pelo seu fôlego interminável como orientadora e mãe me ajudando a dar mais este passo na minha carreira.

Ao meu co-orientador e amigo Prof. Dr. Marcelo de Faveri, também pela orientação deste trabalho e, por abrir mão de momentos particulares para estar realizando a estatística deste trabalho que não foi uma tarefa fácil. Minha eterna gratidão.

À Prof^a. Dr^a. Magda Feres pelos momentos de inigualável conhecimento científico e pela confiança depositada em mim desde o começo.

Ao amigo Prof^o. Dr^o. Jamil A. Shibli, um profissional competente. Obrigado pela ajuda em momentos difíceis e pelos conselhos. Meu respeito.

À Prof^a. Dr^a. Poliana M. Duarte pelo apoio, estímulo e, principalmente, pelos conhecimentos compartilhados. Um exemplo de profissionalismo que deve ser seguido.

Ao amigo e incentivador Prof. Dr. Munir Salomão. Obrigado pelos conselhos e por acreditar em mim desde que nos conhecemos e pela amizade sincera.

Aos meus amigos professores do Mestrado e Doutorado Acadêmico em Odontologia da UnG, Prof. Dr. André F. Reis, Prof. Dr. José A. Rodrigues, Prof^a. Dr^a. Marta F. Bastos, Prof^a. Dr^a. Alessandra C. Ferreira, Prof^a. Dr^a. Cláudia Ota-Tsuzuki, Prof^a. Dr^a. Cristiane M. Amaral, pelo exemplo profissional.

Aos meus amigos de Mestrado: Carlos Eduardo Datte, Maria Josefa Mestnik, Eduardo Sampaio, Marcelo da Rocha, Kelly Cristina D. de Souza Aguiar, Juliana Alethusa Velloso Mendes, Geisla Mary Silva Soares, Joyce Pinho Bezerra, Vanessa Renata Santos Silva, Luiz Gustavo Barrote Albino, Ronaldo Guedes Viotti, Carlos Eduardo Pena, Mario Perito por terem feito deste mestrado momentos inesquecíveis que somente quem estava com vocês sabe do que vocês são capazes. Sempre terei muitas lembranças maravilhosas de todos.

À Bióloga Izilvânia Q. Barreto pela insubstituível ajuda, trabalho e dedicação indispensável em processar os dados no laboratório.

Aos funcionários da Universidade Guarulhos e principalmente do Mestrado em Odontologia, Cíntia Lobo, Adriana Rose, Graziela Lopes ramos e Cristina Zoucas, pela ajuda, apoio, alegria e amizade.

Aos pacientes que participaram das pesquisas clínicas e, indiretamente estão envolvidos nos resultados deste estudo.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar possíveis diferenças no perfil de similaridade da microbiota subgengival de indivíduos com diagnóstico clínico de doença periodontal. Duzentos e vinte indivíduos com doença periodontal, participantes de diferentes pesquisas clínicas sobre terapia periodontal, desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Guarulhos (UnG) foram incluídos neste estudo. Os parâmetros clínicos avaliados em seis sítios por dente foram: profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI), placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração. Nove amostras de biofilme subgengival foram coletadas por indivíduo, de acordo com as seguintes categorias de PS: rasas (PS \leq 3mm), intermediárias (PS 4-6mm) e profundas (PS \geq 7mm). As amostras foram avaliadas, quanto aos níveis e proporções de 40 espécies bacterianas subgengivais pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Os microrganismos do complexo vermelho e laranja apresentaram as maiores médias de contagem e proporção. Com o objetivo de estudar o perfil de similaridade dos indivíduos, dendogramas foram construídos de acordo com os dados microbiológicos. Nove *clusters* foram definidos considerando um perfil de similaridade $>$ 45%. Os níveis de contagem de 19 espécies foram significativamente diferentes entre os grupos. As contagens das espécies bacterianas dos complexos laranja e vermelho nos grupos III, IV e VIII foram baixas, com níveis inferiores a 5×10^5 bactérias. As maiores proporções do complexo vermelho foram observadas nos grupos V (44,0%) e VII (42,6%), seguidos dos grupos II (39,6%), VI (34,5%) e I (27,6%), e dos grupos IX (24,9%), IV (22,7%), VIII (20,7) e III (12,2%). Em relação ao complexo laranja, os grupos I (39,6%) e VII (38,9%) apresentaram as proporções mais elevadas. Por outro lado, inesperadamente, os microrganismos considerados benéficos se destacaram em alguns grupos com proporções elevadas. O complexo azul representou 17,5% no grupo III e 26% no grupo IV; e o complexo amarelo representou 20,6% no grupo III e 16,2% no grupo VIII. Em conclusão, existem diferenças no perfil de similaridade da microbiota subgengival de indivíduos com diagnóstico clínico de doença periodontal. Outros microrganismos, além dos patógenos clássicos do complexo vermelho, podem fazer parte da etiologia da doença periodontal.

Palavras chaves: Doença periodontal; Microbiota subgengival; sondas de DNA.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze possible differences in the profile of similarity of the subgingival microbiota in subjects with clinical diagnosis of periodontal disease. Two hundred and twenty subjects with periodontal disease, participant of different clinical research on periodontal therapy developed for the group of research of the Periodontology Graduate Program of the Guarulhos University (UnG) were included in this study. The clinical parameters evaluated at 6 sites per tooth at baseline were: probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), visible plaque, gingival bleeding, bleeding on probing and suppuration. Nine subgingival biofilm samples were collected per subject, 3 samples in each of the following initial PD categories: shallow (PS \leq 3mm), moderate (PS 4-6 mm), and deep (PS \geq 7mm). The samples were evaluated for the presence and levels of 40 bacterial subgingival species using checkerboard DNA-DNA hybridization. The samples were evaluated for the levels and proportions of 40 bacterial subgingival species using checkerboard DNA-DNA hybridization. The microorganism of the red and orange complex presented the higher mean level of counts and proportion. With the objective to study the profile of similarity of the individuals, dendrogram had been constructed in accordance with the microbiological data. Nine clusters were formed at $> 45\%$ similarity. The levels of 19 species had been significantly different between the groups. The counts of species of the orange and red complexes were lowest in groups III, IV and VIII, with the inferior levels at 5×10^5 bacteria. The more elevated ratios of the red complex had been observed in groups V (44.0%) and VII (42.6%), followed of the groups II (39.6%), VI (34.5%) and I (27.6%), and of the groups IX (24.9%), IV (22.7%), VIII (20.7) and III (12.2%). About orange complex, the groups I (39.6%) and VII (38.9%) showed the more elevated proportions. On the other hand, unexpectedly, in some groups the benefit microorganisms were in high ratios. The blue complex represented 17.5% in group III and 26% in group IV; and the yellow complex represented 20.6% in group III and 16.2% in group VIII. In conclusion, there are differences in the profile of similarity of subgingival microbiota of the individuals with clinical diagnosis of periodontal disease. Other microorganisms can do a role in the periodontal disease etiology, above the classic pathogens of the red complex .

Key-words: Periodontal disease; subgingival microbiota; DNA probe.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação gráfica do <i>Minislot</i> (Immunitics, Cambridge, MA, USA) e resumo da preparação e deposição das amostras de biofilme subgengival (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>)	25
Figura 2	Representação gráfica do <i>Miniblotter</i> (Immunitics, Cambridge, MA, USA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>)	27
Figura 3	Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>)	28
Figura 4	Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>). Nesta figura estão apresentadas 40 bactérias, e as amostras de biofilme são de todos os dentes de um mesmo indivíduo	29
Figura 5	Médias de contagem ($\times 10^5$) e da proporção das sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de indivíduos com periodontíte.....	33
Figura 6	Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival de indivíduos com periodontíte.....	33
Figura 7	Dendogramas construídos a partir dos dados microbiológicos de indivíduos com periodontite.....	36
Figura 8	Médias de contagem ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos dez grupos encontrados.....	38
Figura 9	Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival nos dez grupos encontrados.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA	26
Tabela 2.	Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgingival	30
Tabela 3.	Média (\pm Desvio Padrão) dos parâmetros clínicos de indivíduos com periodontite.....	32
Tabela 4.	Média (\pm DP) dos parâmetros clínicos de indivíduos com doença periodontal, nos dez grupos encontrados.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
1.1	Etiologia da doença periodontal	14
1.1.1	Outros possíveis patógenos.....	16
2	PROPOSIÇÃO	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Seleção da amostra	20
3.2	Critérios de inclusão e exclusão	20
3.3	Delineamento experimental	21
3.4	Avaliação clínico-periodontal	21
3.5	Avaliação microbiológica	22
3.5.1	<i>Seleção dos sítios-teste</i>	22
3.5.2	<i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	23
3.6	Perfil de similaridade	30
3.7	Análise estatística	30
3.7.1	<i>Avaliação clínica</i>	30
3.7.2	<i>Avaliação microbiológica</i>	31
4	RESULTADOS	32
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é caracterizada como uma doença infecciosa que tem como fator etiológico microrganismos específicos presentes no biofilme bucal, que acometem as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, levando à perda de inserção, de tecido ósseo e eventualmente do elemento dentário (SOCRANSKY et al., 1998; AAP, 1999; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). A forma mais comum da doença periodontal é a crônica e apesar de sua etiopatogenia ser conhecida e bem estudada, ainda não existe um padrão ideal de terapia para todos os pacientes.

O ponto de partida para se definir uma terapia, seja em odontologia ou nas diversas áreas da medicina, é a compreensão da etiologia e progressão das diferentes enfermidades. Neste contexto, vale ressaltar que as doenças periodontais são um grupo de infecções que possuem como fator etiológico primário as bactérias presentes na cavidade oral, especialmente as que colonizam as superfícies dos dentes, supra e subgingivalmente. Muitos avanços, ocorridos principalmente nas duas últimas décadas, facilitaram o entendimento da etiopatogenia das periodontites, incluindo a microbiota patogênica relacionada a cada tipo de doença e o perfil do hospedeiro. Esses conhecimentos têm facilitado o direcionamento de terapias mais específicas para cada paciente.

Em termos da microbiota, já está bem estabelecido na literatura que a gengivite é decorrente do acúmulo indiferenciado de bactérias na margem gengival, enquanto que a destruição periodontal se relaciona não somente à quantidade de biofilme, mas, principalmente, a sua composição (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2006). Vários estudos demonstraram que certos microrganismos ou grupos de microrganismos se relacionam com o início e a progressão da perda de inserção periodontal, enquanto que outras espécies, consideradas compatíveis com o hospedeiro, estão mais associadas com saúde periodontal (TELES et al., 2006).

Até o momento ainda não é decisivo porque alguns pacientes, sistemicamente saudáveis, com quadros clínicos semelhantes respondem de maneira mais limitada às terapias periodontais do que outros. Dessa forma, o

estudo detalhado da composição do biofilme subgengival em indivíduos com doença periodontal crônica poderá contribuir para o maior entendimento da importância da microbiota na escolha terapêutica.

1.1 Etiologia da doença periodontal

Certos microrganismos presentes nos biofilmes orais têm sido relacionados com o início e a progressão da periodontite (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Porém, a simples presença dessas bactérias na cavidade bucal não determina que o indivíduo desenvolva a doença. O equilíbrio entre o hospedeiro e a microbiota bucal é uma situação benigna e não oferece riscos para as estruturas de suporte dos dentes. Ocasionalmente, um grupo de bactérias pode proliferar ou exibir novas propriedades que levem a destruição do periodonto. Pode-se assim considerar que a doença periodontal se desenvolve a partir de um desequilíbrio na interação entre o hospedeiro e os microrganismos (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). O percentual de sítios colonizados por esses patógenos e a capacidade do organismo em combater os microrganismos agressores são condições fundamentais para o aparecimento de sinais clínicos da doença periodontal. O clássico estudo de “gingivite experimental” (LÖE et al. 1965) mostrou que o acúmulo de placa bacteriana na ausência de higiene oral, em indivíduos saudáveis, por um período de 21 dias, leva impreterivelmente a instalação de um processo inflamatório gengival. Este mesmo estudo demonstrou que a remoção da placa e a instituição de hábitos de higiene bucal são capazes de reverter o processo inflamatório.

Naquela época, acreditava-se que a doença periodontal era oriunda de um supercrescimento da placa bacteriana, de forma que qualquer microrganismo presente no ambiente subgengival poderia contribuir ativamente para a destruição dos tecidos; e este conceito ficou conhecido como “Hipótese da Placa Não Específica” (LOVDAL et al., 1958; SCHEI et al., 1959; LÖE et al., 1965; THEILADE et al., 1966; LÖE et al., 1967; RUSSEL, 1967). Todavia, investigações epidemiológicas realizadas na década de 80 vieram a contradizer esta hipótese (LÖE et al., 1986; BAELUM et al., 1988). Nestes estudos foram observados indivíduos que, mesmo com uma quantidade considerável de placa

bacteriana, não desenvolviam doença periodontal, enquanto outros indivíduos com quantidades reduzidas de placa apresentavam uma rápida destruição tecidual. Retomou-se, então, o conceito da especificidade microbiana da doença periodontal, que ficou conhecido como “Hipótese da Placa Específica” (LOESCHE, 1976). Esta hipótese é aceita até os dias atuais e sugere que a placa bacteriana subgingival presente em lesões de periodontite é qualitativa e quantitativamente diferente da placa presente em sítios saudáveis (ROSENBERG et al., 1981; HINRICHS et al., 1985; DZINK et al., 1988; ADRIAENS et al., 1988; ALBANDAR et al., 1990; CHRISTERSSON et al., 1992; LOESCHE, 1992) e que diferentes formas da doença estão associadas às diferentes espécies bacterianas ou grupos de bactérias (LOESCHE et al. 1985; MARSH, 1992; HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994; SOCRANSKY et al., 1998). Sabe-se hoje que apesar de mais de 600 espécies bacterianas terem sido isoladas e identificadas na cavidade bucal (SLOTS, 1977; MOORE et al., 1987; LOESCHE & KAZOR, 2002), nem todas possuem papel determinante na etiologia da doença periodontal.

O desenvolvimento, na década de 90, de técnicas imunológicas e de biologia molecular para a detecção dos microrganismos que compõem os biofilmes orais foi importante para uma descrição mais precisa das espécies bacterianas subgingivais relacionadas a diferentes formas de periodontite (CHRISTERSSON et al., 1987; ÁVILA-CAMPOS et al., 1999; SOCRANSKY et al., 1994; GOMES et al., 2006). A grande vantagem dessas técnicas é a possibilidade de detecção de microrganismos fastidiosos como a *Tannerella forsythia* e as espiroquetas, espécies difíceis de serem detectadas pelos métodos tradicionais de diagnóstico, como a cultura bacteriana.

Socransky et al. (1994) descreveram a técnica de diagnóstico microbiológico do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* que utiliza sondas de DNA para o diagnóstico microbiológico, e analisaram as associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgingival de indivíduos com periodontite crônica (SOCRANSKY et al., 1998). Os autores observaram a presença de cinco complexos bacterianos principais neste ambiente subgingival, de acordo com a relação entre as diferentes espécies. Um dos complexos, composto pelas espécies *T. forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, chamado de complexo vermelho, foi fortemente

relacionado com profundidade de sondagem e sangramento à sondagem. Outro complexo, o laranja, que parece preceder a colonização do complexo vermelho foi dividido em dois grupos, um central, composto por *Fusobacterium nucleatum* (*Fusobacterium nucleatum* ss. *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* ss. *polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum* ss. *vincentii*), *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*; e outro grupo periférico, formado por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus*. Os outros três complexos, o amarelo, o verde e o roxo, demonstraram grande associação entre si e menor associação com os dois primeiros, e são compostos por diversas espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro. O complexo verde é formado por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a; o complexo amarelo é composto por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*; e o complexo roxo inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As espécies de *Selenomonas noxia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo b não se correlacionaram com outras espécies. Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* genoespécies I e II) foram agrupadas no complexo azul (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

1.1.1 Outros possíveis patógenos

Alguns estudos em microbiologia oral, realizados na última década, têm proporcionado evidências adicionais do papel de outros patógenos na etiologia da doença periodontal e, assim, novos candidatos estão sendo sugeridos. Neste contexto, o foco dos pesquisadores está voltado para outros microrganismos diferentes daqueles usualmente considerados periodontopatógenos (*A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*). Na maioria dos casos, estudos de associação confirmaram a relação entre espécies já consideradas possíveis patógenos e a etiologia das doenças

periodontais, incluindo *P. intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *E. corrodens*, *P. nigrescens*, *C. gingivalis*, *T. denticola*, *Treponema socranskii*, *V. parvula* e *C. rectus* (CHOI et al., 2000; PAPAPANOU et al., 2000; SANZ et al., 2000; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000; van WINKELHOFF et al., 2002; DAROUT et al., 2003; HAFFAJEE et al., 2004; LOPEZ et al., 2004; GAJARDO et al., 2005; van WINKELHOFF et al., 2005). Outras espécies também têm sido associadas com a doença periodontal, porém com menor frequência: *Eubacterium saphenum* e *Mogibacterium timidum* (MAYANAGI et al., 2004), *Prevotella corporis*, *Prevotella disiens* e *Peptostreptococcus magnus* (SALARI et al., 2004), *E. nodatum* e *Slackia exigua* (BOOTH et al., 2004), e *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Bartonella sp* (COLOMBO et al., 2002).

Kumar et al. (2003), por meio da técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), observaram associações com periodontite crônica para algumas novas espécies ou filotipos, incluindo clones não-cultiváveis: *Deferribacteres*, *Bacteroides*, OP11 e TM7, bem como as espécies denominadas *E. saphenum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola* e *Cryptobacterium curtum*. Dewhirst et al. (2000) encontraram uma forte associação de uma população de *Treponema* em sítios periodontais, envolvendo espécies cultiváveis e não-cultiváveis: *T. denticola*, *Treponema maltophilum* e *Treponema sp. Smibert-3*. Wyss et al. (1996, 1997, 1999, 2001, 2004) isolaram cinco espécies de treponemas de lesões periodontais e sugeriram a nova nomenclatura: *Treponema amylovorum* sp. nov., *Treponema parvum* sp. nov., *Treponema lecithinolyticum* sp. nov., *Treponema putidum* sp. nov., *Treponema matophilum* sp. nov. Também tem sido sugerido que a espécie *Exiguobacterium aurantiacum* pode representar um papel potencial na doença periodontal (ZIJNGE et al., 2003). Em 2008, LaGier & Threadgill, mais uma vez, destacaram a possível importante participação do *C. rectus* em alguns casos de doença periodontal. Mais recentemente, Vartoukian et al. (2009) demonstraram a diversidade e morfologia de membros do filo *Synergistetes* na saúde e doença periodontal. A partir dos resultados obtidos, os autores sugeriram a associação da *Synergistetes* OTU 4.2 com a periodontite e, conseqüentemente, com a patogenia da doença.

Desde 1996 a literatura (AAP, 1996) confirmou o papel do *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* como os verdadeiros patógenos periodontais. A partir daí, novas investigações sugeriram uma extensa lista com outros microrganismos. Entretanto, muitas das pesquisas que indicaram novos patógenos são estudos de associação que examinaram um número limitado de indivíduos, amostras e/ou espécies. A presente investigação tentará entender a participação de patógenos periodontais por meio da análise da microbiota subgengival de um grande número de indivíduos com periodontite. Provavelmente, a análise desses dados tornará evidente o fato de que muitos indivíduos com doença apresentam baixos níveis e proporções dos patógenos considerados verdadeiros (*A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *P. gingivalis*) e, talvez, outras espécies estarão associadas com a doença nesses indivíduos.

2 PROPOSIÇÃO

Analisar possíveis diferenças no perfil de similaridade da microbiota subgingival de indivíduos com diagnóstico clínico de periodontite.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção da amostra

Os dados iniciais dos exames clínico e microbiológico de 220 indivíduos participantes de diferentes pesquisas clínicas sobre terapia periodontal, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Guarulhos (UnG) foram incluídos neste estudo. A amostra total foi selecionada, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão abaixo descritos, a partir de um banco de dados com 350 pacientes. Independentemente do estudo ao qual o indivíduo participava, a seleção foi realizada por mestrandos em Odontologia (n=3), área de concentração em periodontia, sob supervisão dos professores da disciplina. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e coletas necessárias, além das terapias propostas. A participação foi voluntária e os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo com a Resolução nº 196/96 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde. Todas as pesquisas de origem dos pacientes foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

Para a inclusão no estudo, a seleção dos participantes respeitou os seguintes critérios:

- Voluntários portadores de doença periodontal generalizada - crônica ou agressiva;
- Possuir um mínimo de 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Mínimo de seis dentes com pelo menos um sítio interproximal, não contíguo, com profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI) entre 5 e 10mm, preferencialmente distribuídos em sextantes distintos.

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Gestantes ou lactantes;
- Histórico de tratamento periodontal prévio nos últimos seis meses;
- Histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- Histórico de uso de antissépticos orais nos últimos seis meses;
- Doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento;
- Reabilitações protéticas extensas.

3.3 Delineamento experimental

Após a seleção, os participantes do estudo responderam a um questionário de saúde (anamnese). Inicialmente todos os indivíduos foram submetidos a exame clínico-periodontal completo e coleta de amostras de biofilme subgengival, de acordo com o protocolo especificado nas duas sessões seguintes (ver 3.4 Avaliação clínico-periodontal e 3.5 Avaliação microbiológica). Todos os indivíduos receberam terapia periodontal de acordo com o protocolo terapêutico específico da pesquisa a qual ele pertencia.

3.4 Avaliação clínico-periodontal

O exame clínico-periodontal foi efetuado no início do estudo a fim de realizar o diagnóstico do indivíduo. Três examinadores foram treinados e calibrados com o objetivo de conseguir a máxima reprodutibilidade nas medições realizadas por cada um deles e entre eles. A metodologia utilizada para a calibração foi preconizada por Araújo et al. (2003), que avaliaram o erro padrão da medida (e.p.m.) e o erro médio percentual (e.m.p.) para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção). O e.p.m e o e.m.p variaram entre 0,09 mm - 0,31 mm e 2,0% - 5,79%, respectivamente. Para as variáveis categóricas considerando a presença ou ausência do parâmetro clínico, foi realizada a média do nível de

concordância para cada examinador e entre eles, obtendo-se concordância superior a 92% (Teste Kappa).

As mensurações clínicas foram realizadas em seis sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares), utilizando-se sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15 HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os parâmetros clínicos avaliados incluíram:

- Índice de Placa Visível - (IPV) (AINAMO & BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa supragengival visível;
- Índice de Sangramento Gengival - (ISG) (AINAMO & BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento da 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 cimento-esmalte 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 a sonda periodontal milimetrada;
- Supuração - (SUP): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de SUP espontânea ou após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada.

3.5 Avaliação microbiológica

3.5.1 Seleção dos sítios-teste

Foram selecionados nove sítios em cada voluntário, distribuídos uniformemente de acordo com a profundidade de sondagem inicial nas seguintes categorias (três sítios por categoria): rasas ($PS \leq 3\text{mm}$), intermediárias ($PS 4-6\text{ mm}$), e profundas ($PS \geq 7\text{mm}$). Quando um dos três

sítios profundos não foi encontrado, o mesmo foi substituído por sítio intermediário. Estes sítios estavam localizados em faces dentais interproximais não-contíguas, e preferencialmente distribuídos entre os quatro quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados.

3.5.2 Checkerboard DNA-DNA Hybridization

Cepas bacterianas e condições de crescimento

Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) ou do *Forsyth Institute* (Boston, MA, USA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10%H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado e 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado, 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma). *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose, 400µg/ml de niaciamida, 150µg/ml espermina tetraidroclorídrica, 20µg/ml de isobutirato de Na, 1mg/ml de L-cisteína, 5µg/ml de tiamina pirofosfato e 0,5% de soro bovino.

Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram anaerobicamente cultivadas na superfície de ágar-sangue contido em placas de Petri, com exceção das duas espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo de cultura, por 3 - 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos de microcentrífuga de 1,5ml contendo 1ml de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação na solução-tampão de

TE a 3.500 gp por 10 minutos. Em seguida, as células das cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, $C_{12}H_{25}NaO_4S$) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). As cepas Gram-positivas foram lisadas em 150 μ l de uma mistura enzimática contendo 15mg/ml de lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão de TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith *et al.* (1989). As sondas multi-genômicas (*whole-genomic*) foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 μ g do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies bacterianas avaliadas foram selecionadas segundo sua associação com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994).

Coleta de amostras de biofilme subgengival

Após a remoção do biofilme supragengival, as amostras de biofilme subgengival foram coletadas utilizando curetas Gracey do tipo mini-five (HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), posicionadas na porção mais apical dos nove sítios previamente selecionados para o exame microbiológico. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150 μ l de solução TE (pH 7,6), ao qual foram adicionados 100 μ l de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo. Estes tubos foram então identificados e armazenados até serem analisados por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para as 40 cepas bacterianas descritas na Tabela 1, no laboratório de microbiologia da Universidade Guarulhos.

Hibridização DNA-DNA

As suspensões contidas nos tubos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão de biofilme bacteriano contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* (Immunitics, Cambridge, MA, USA- Figura 1) ficando, assim, concentrada em uma membrana de *nylon* (15 x

15cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim). As duas últimas canaletas do *Minislot* (Immunelectrics) foram ocupadas por controles contendo uma mistura do DNA das espécies de microrganismos investigadas pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1ng e 10ng de DNA de cada espécie, respectivamente (SOCRANSKY et al., 1994; HAFFAJEE et al., 1997a, b). A membrana foi então removida do *Minislot* (Immunelectrics) e o DNA nela concentrado foi fixado por meio de aquecimento em forno a 120°C por 20 minutos.

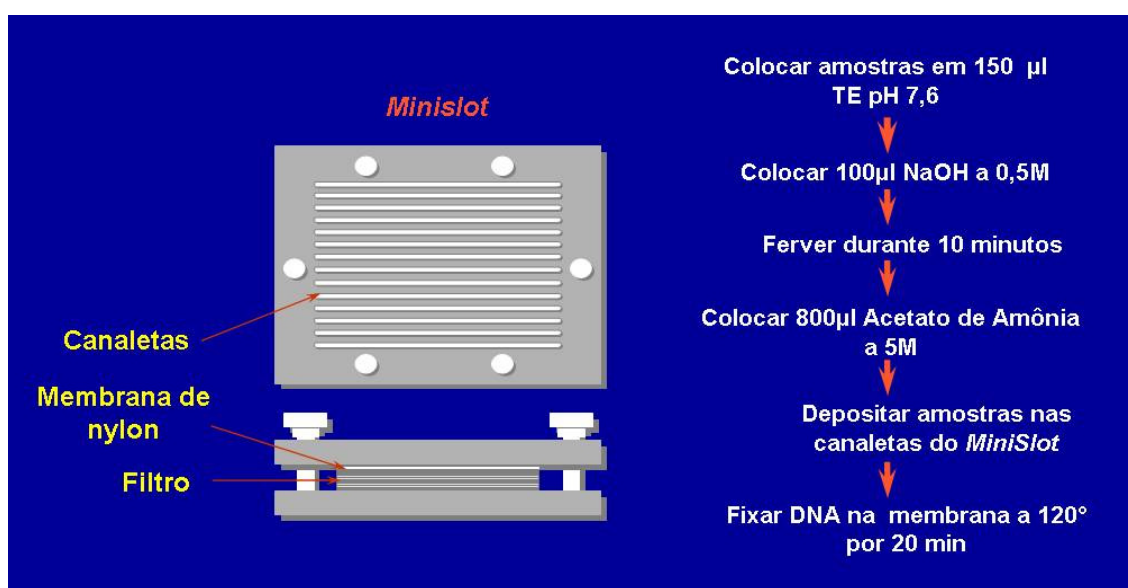


Figura 1. Representação gráfica do *Minislot* (Immunelectrics, Cambridge, MA, USA) e resumo da preparação e deposição das amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

A membrana foi pré-hibridizada a 42°C , por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5 x *standard saline citrate* -SSC (1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim).

Tabela 1. Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

Espécies	Cepas	Espécies	Cepas
Actinomyces sp		Complexo Laranja (cont.)	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp.	
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp.	
<i>Actinomyces naeslundii II</i>	43146 ^a	<i>polymorphum</i>	10953 ^a
Complexo Roxo		<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp.	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>vincentii</i>	49256 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
Complexo Amarelo		<i>Parvimonas micra</i>	33270 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a	Complexo Vermelho	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
Complexo Verde		<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Aggregatibacter</i>	43718 ^a	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>actinomycetemcomitans a + b</i>	29523 ^a	Outras Espécies	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
Complexo Laranja		<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	11827 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a		11828 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a	<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
		<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b

^a ATCC (American Type Culture Collection)

^b Forsyth Institute

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* (Immunelectrics, Figura 2) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* (Immunelectrics) foi adicionada uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130 µl de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período mínimo de 20 horas, a 42° C.

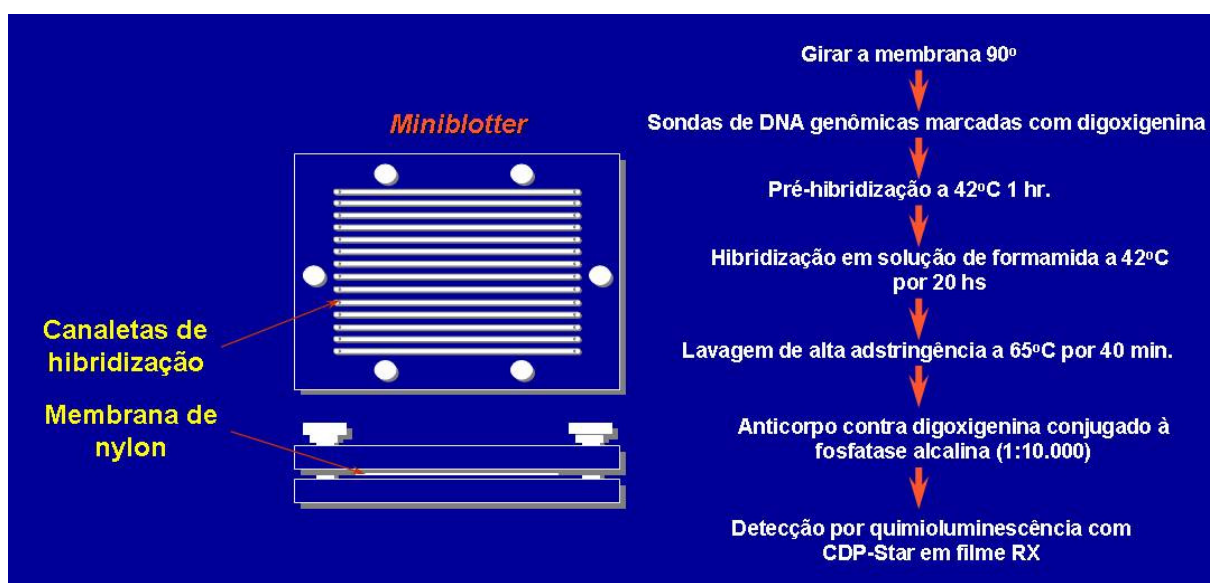


Figura 2. Representação gráfica do *Miniblotter* (Immunelectrics, Cambridge, MA, USA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* (Immunelectrics) lavada por 40 minutos, a 65°C numa solução adstringente composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C₄H₄O₄), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma

concentração de 1:10.000. A membrana foi depois lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, 50 mM de MgCl₂, pH 9,5.

Os próximos passos foram a incubação da membrana por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-StarTM Detection Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England, UK). A seguir, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30x40cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca Kodak X-Omat K, 18x24cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado (Figuras 3 e 4) manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, sempre mantidas à temperatura de 20°C.

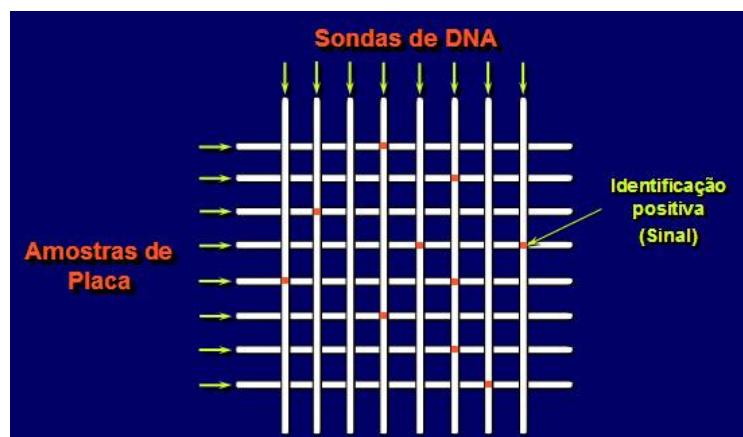


Figura 3. Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

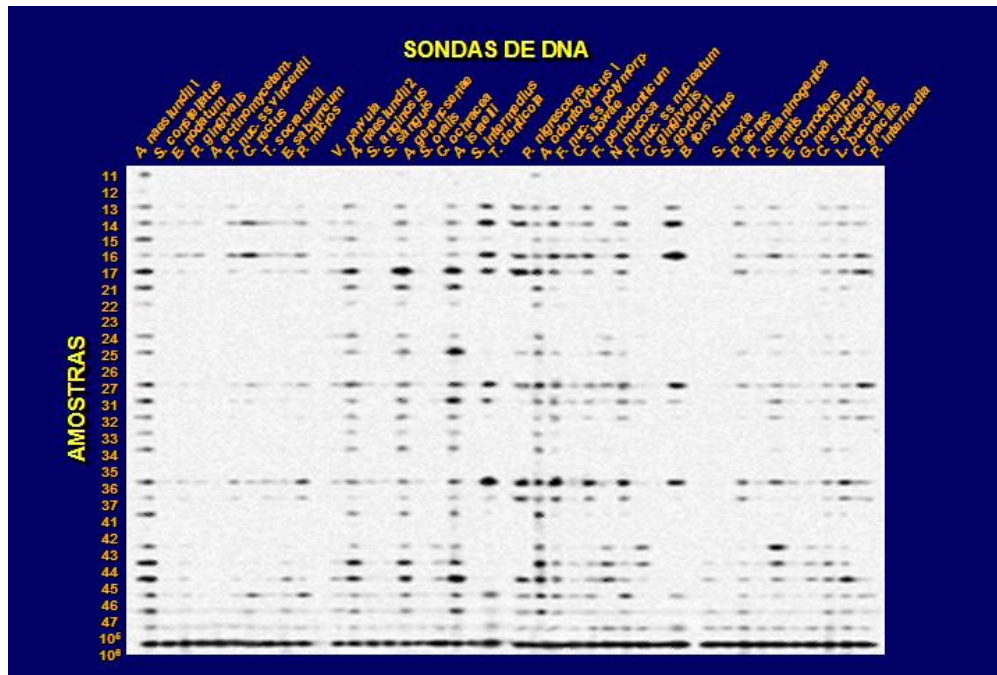


Figura 4. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*). Nesta figura estão apresentadas 40 bactérias, e as amostras de biofilme são de todos os dentes de um mesmo indivíduo.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a aproximadamente 10^5 células; 3, entre 10^5 e 10^6 células; 4 aproximadamente 10^6 células e 5, mais de 10^6 células (Tabela 2). Estes registros foram então utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nos sítios e indivíduos do estudo.

Tabela 2. Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival.

ÍNDICE	NÍVEL DO MICRORGANISMO	CONTAGEM
0	Não detectado	0
1	Menos de 10^5 células	10.000
2	Aproximadamente 10^5 células	100.000
3	Entre 10^5 e 10^6 células	500.000
4	Aproximadamente 10^6 células	1.000.000
5	Mais de 10^6 células	10.000.000

3.6 Perfil de similaridade

Os dados microbiológicos foram expressos em níveis de contagem $\times 10^5$ células bacterianas para cada espécie dentro de cada sítio. Em seguida, os dados microbiológicos dos três sítios rasos, três sítios intermediários e três sítios profundos foram agrupados individualmente dentro de cada indivíduo. Os dados microbiológicos foram ajustados conforme o perfil clínico do exame inicial, ou seja, foram atribuídos pesos para cada categoria de PS de acordo com a respectiva porcentagem de sítios presentes na boca. Posteriormente a este ajuste, matrizes de similaridade (dendogramas) foram construídas utilizando-se o coeficiente de Chord (LUDWIG & REYNOLDS, 1988) e os resultados foram ponderados pela classificação da associação das médias (SNEATH & SOKAL, 1973).

3.7 Análise estatística

3.7.1 Avaliação clínica

A média das medidas clínicas de PS e NCI, assim como a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, SS e supuração foram computadas para cada indivíduo e, posteriormente, dentro do grupo. As diferenças entre os grupos formados a partir da análise de similaridade (clusters) foram avaliadas utilizando o teste Kruskal-Wallis e teste U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$).

3.7.2 Avaliação microbiológica

Os dados microbiológicos foram computados para cada indivíduo e depois dentro do grupo. Em seguida foram expressos em contagens (níveis) e % de contagem das sondas de DNA (proporção de cada espécie em relação as demais, $n=40$). Diferenças nos níveis ou nas proporções das diferentes espécies entre os clusters foram avaliadas utilizando o teste Kruskal-Wallis e teste U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em 5%.

4 RESULTADOS

A análise dos dados obtidos na avaliação clínica e microbiológica dos 220 indivíduos está apresentada nas Tabela 3 e Figura 5. Os dados da Tabela 3 demonstram que os indivíduos selecionados para o estudo eram portadores de periodontite e apresentaram médias de boca toda para os parâmetros de PS e NCI de $3,98 \pm 0,7$ mm e $4,47 \pm 0,9$ mm, respectivamente.

Tabela 3. Média (\pm Desvio Padrão) dos parâmetros clínicos de indivíduos com periodontite.

Variáveis	Média (\pm DP)
Gênero (%Masculino / %Feminino)	37,3 / 62,7
Idade (anos)	$42,2 \pm 15,8$
Profundidade de Sondagem (mm)	$3,98 \pm 0,7$
Nível Clínico de Inserção (mm)	$4,47 \pm 0,9$
% sítios com	
Placa Visível	$74,14 \pm 18,9$
Sangramento Gengival	$33,36 \pm 26,7$
Sangramento à Sondagem	$70,5 \pm 21,3$
Supuração	$3,18 \pm 7,3$

Em relação à avaliação microbiológica, a Figura 5 mostra a média de contagem ($\times 10^5$) e a média da proporção das sondas de DNA das 40 espécies bacterianas analisadas nas amostras de biofilme subgengival. Considerando tanto a variável contagem como a variável proporção, as maiores médias foram observadas para os complexos laranja e vermelho. A Figura 6 apresenta as proporções dos complexos microbianos nas amostras de biofilme subgengival de todos os indivíduos. As 40 espécies microbianas identificadas por meio das

sondas de DNA foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Socransky et al. (1998). As proporções das espécies pertencentes a cada complexo foram somadas e a proporção total de cada complexo foi determinada. Pode-se observar que as maiores proporções foram dos complexos microbianos laranja (30,8%) e vermelho (21,1%). As proporções dos demais complexos foram as seguintes: azul, 13,9%; roxo, 5,1%; amarelo, 8,9%; verde, 9,3% e outras espécies, 10,9%.

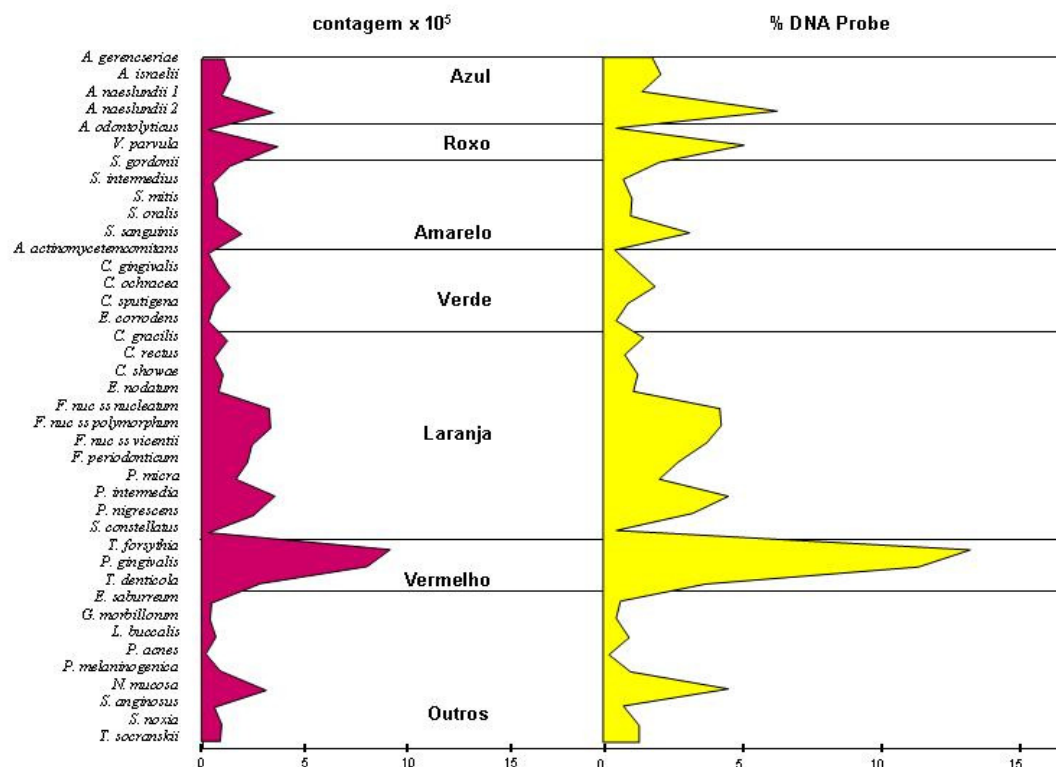


Figura 5. Médias de contagem ($\times 10^5$) e da proporção das sondas de DNA das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival de indivíduos com doença periodontal.

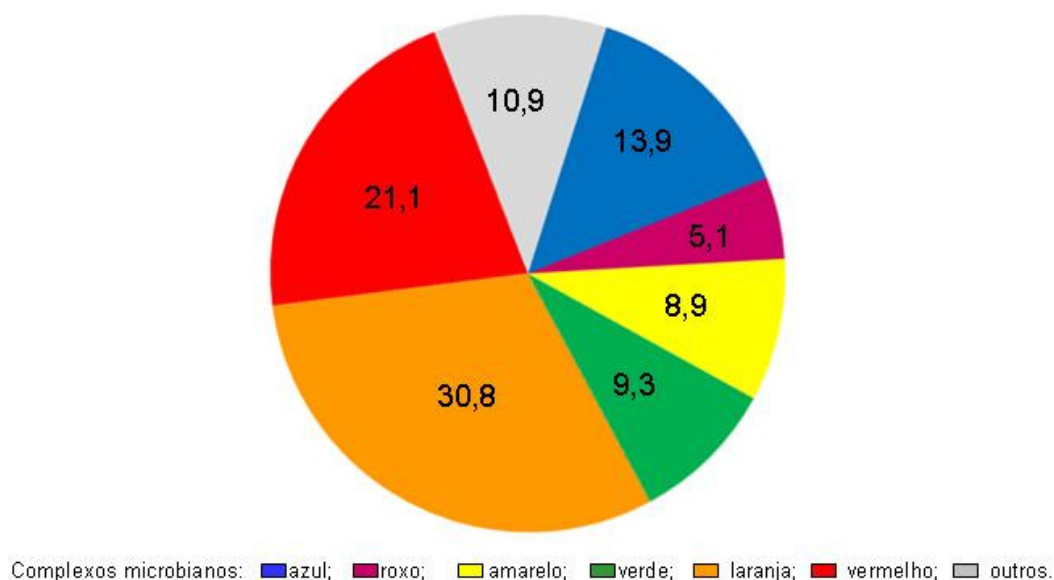


Figura 6. Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival de indivíduos com doença periodontal.

Com o objetivo de estudar o perfil de similaridade dos indivíduos, dendogramas foram construídos pelos os dados microbiológicos (Figura 7). Considerando um perfil de similaridade de 45%, os resultados demonstraram a formação de nove *clusters* entre os 2195 indivíduos selecionados para o estudo. Além disso, 25 indivíduos não se enquadraram em nenhum dos perfis de similaridade e, dessa forma, foram reunidos em um único grupo. A Tabela 4 apresenta a média das variáveis PS, NCI e percentual de sítios com PS \geq 7mm para os dez grupos encontrados, e os resultados demonstraram que esses grupos eram homogêneos em relação aos parâmetros clínicos ($p > 0,05$).

A Figura 8 apresenta a média de contagem ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas analisadas e o número total de indivíduos incluídos em cada um dos dez grupos encontrados. Os níveis de contagem de 19 espécies foram significativamente diferentes entre os grupos, sendo: *A. naeslundii* 2, *V. parvula*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *E. saburreum*, *L. buccalis*, *P. acnes*, *P. melaninogenica*, *S. noxia*. São notáveis as baixas contagens das bactérias dos complexos laranja e vermelho nos grupos III, IV e VIII, com níveis inferiores a 5×10^5 bactérias. O complexo vermelho nos demais grupos apresentou, em média, 13×10^5 bactérias.

As proporções dos complexos microbianos estão apresentadas na Figura 9. A área dos gráficos foi ajustada para refletir a diferença da contagem total de bactérias nas amostras de biofilme subgengival entre os grupos encontrados. As espécies bacterianas identificadas por meio das sondas de DNA foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Socransky *et al.* (1998). As proporções das espécies pertencentes a cada complexo foram somadas e a proporção total de cada complexo foi determinada. As diferenças estatísticas foram destacadas na própria Figura 9. As maiores proporções do complexo vermelho foram observadas nos grupos V (44,0%) e VII (42,6%), seguidos dos grupos II (39,6%), VI (34,5%) e I (27,6%), e dos grupos IX (24,9%), IV (22,7%), VIII (20,7) e III (12,2%). Em relação ao complexo laranja, os grupos I (39,6%) e VII (38,9%) apresentaram as

proporções mais elevadas. Por outro lado, inesperadamente, os microrganismos considerados benéficos se destacaram em alguns grupos com proporções elevadas. O complexo azul representou 17,5% no grupo III e 26% no grupo IV; e o complexo amarelo representou 20,6% no grupo III e 16,2% no grupo VIII.

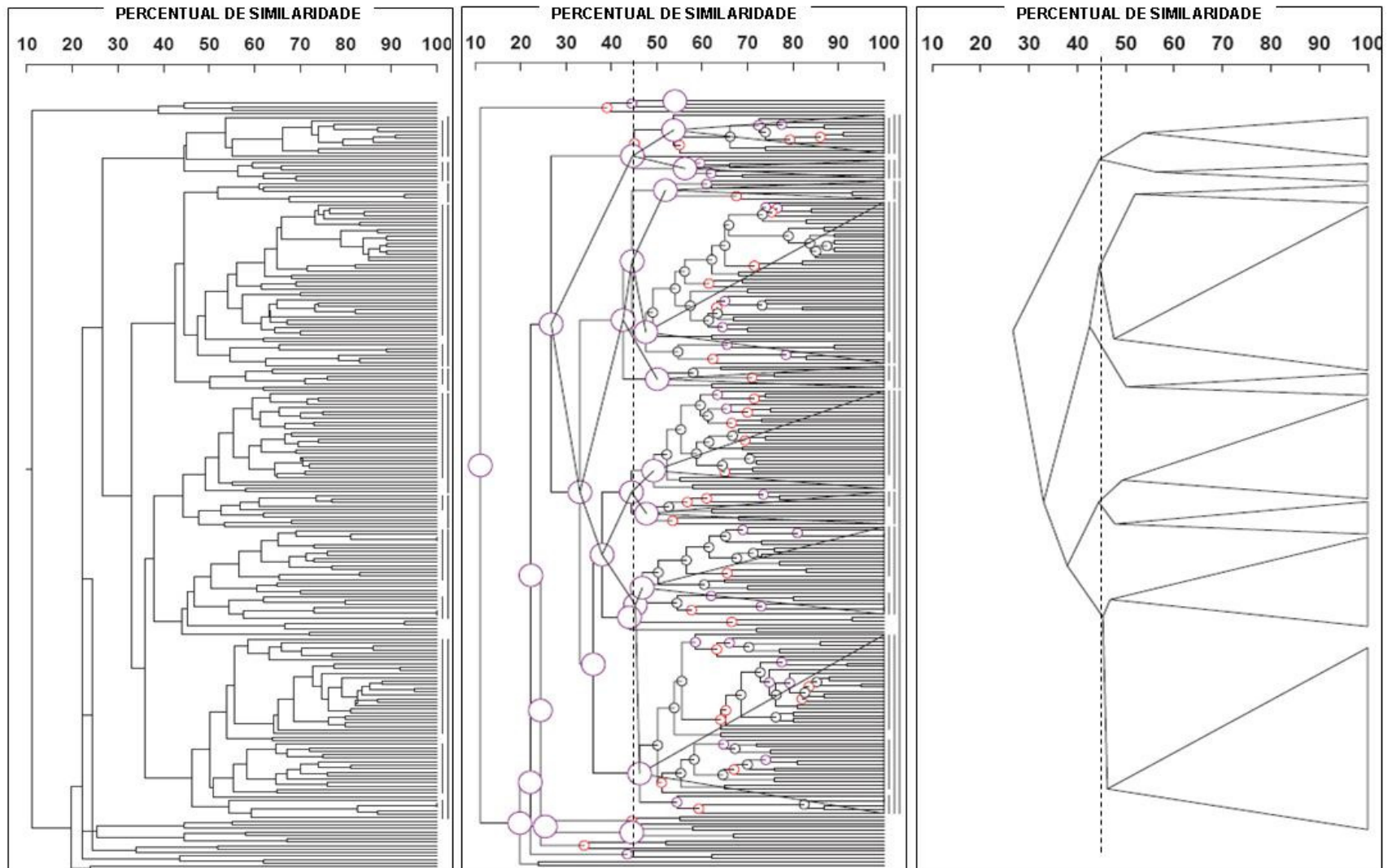


Figura 7. Dendogramas construídos a partir dos dados microbiológicos de indivíduos com periodontite.

Tabela 4. Média (\pm DP) dos parâmetros clínicos de indivíduos com doença periodontal, nos dez grupos encontrados.

Variáveis	Grupos Experimentais									
	NI	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
N=	25	12	6	6	47	7	29	10	26	52
PS (mm)	3,9 \pm 0,7	4,4 \pm 0,9	4,7 \pm 1,9	3,7 \pm 0,4	4,1 \pm 0,7	3,5 \pm 0,3	4,1 \pm 0,8	3,9 \pm 0,6	3,9 \pm 0,8	3,9 \pm 0,8
NCI (mm)	4,5 \pm 1,1	4,9 \pm 1,2	5,1 \pm 1,7	4,4 \pm 0,6	4,6 \pm 1,1	3,9 \pm 0,7	4,4 \pm 1,1	4,6 \pm 0,8	4,3 \pm 1,1	4,5 \pm 1,0
PS \geq 7mm (% sítios)	7,2 \pm 6,5	9,0 \pm 7,9	10,2 \pm 6,4	7,0 \pm 5,8	11,5 \pm 14,2	4,9 \pm 2,79	13,2 \pm 11,7	12,8 \pm 13,8	9,5 \pm 11,6	9,5 \pm 11,0

PS: Profundidade de Sondagem; NCI: Nível Clínico de Inserção; NI: Não incluído nos *clusters*.
 Diferenças entre os grupos: Teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

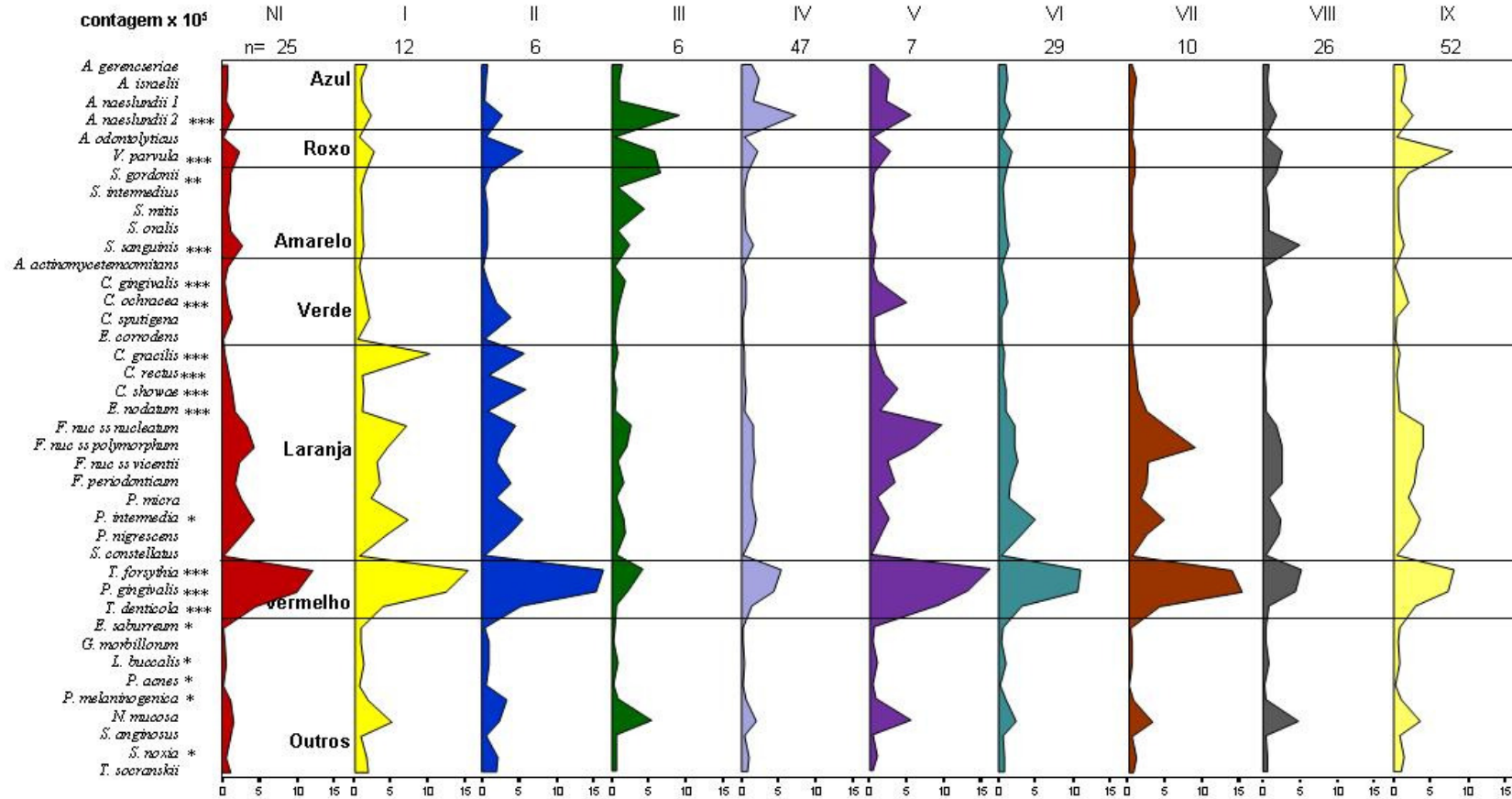


Figura 8. Médias de contagem ($\times 10^5$) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival nos dez grupos encontrados. NI: Não incluído nos clusters. Teste Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

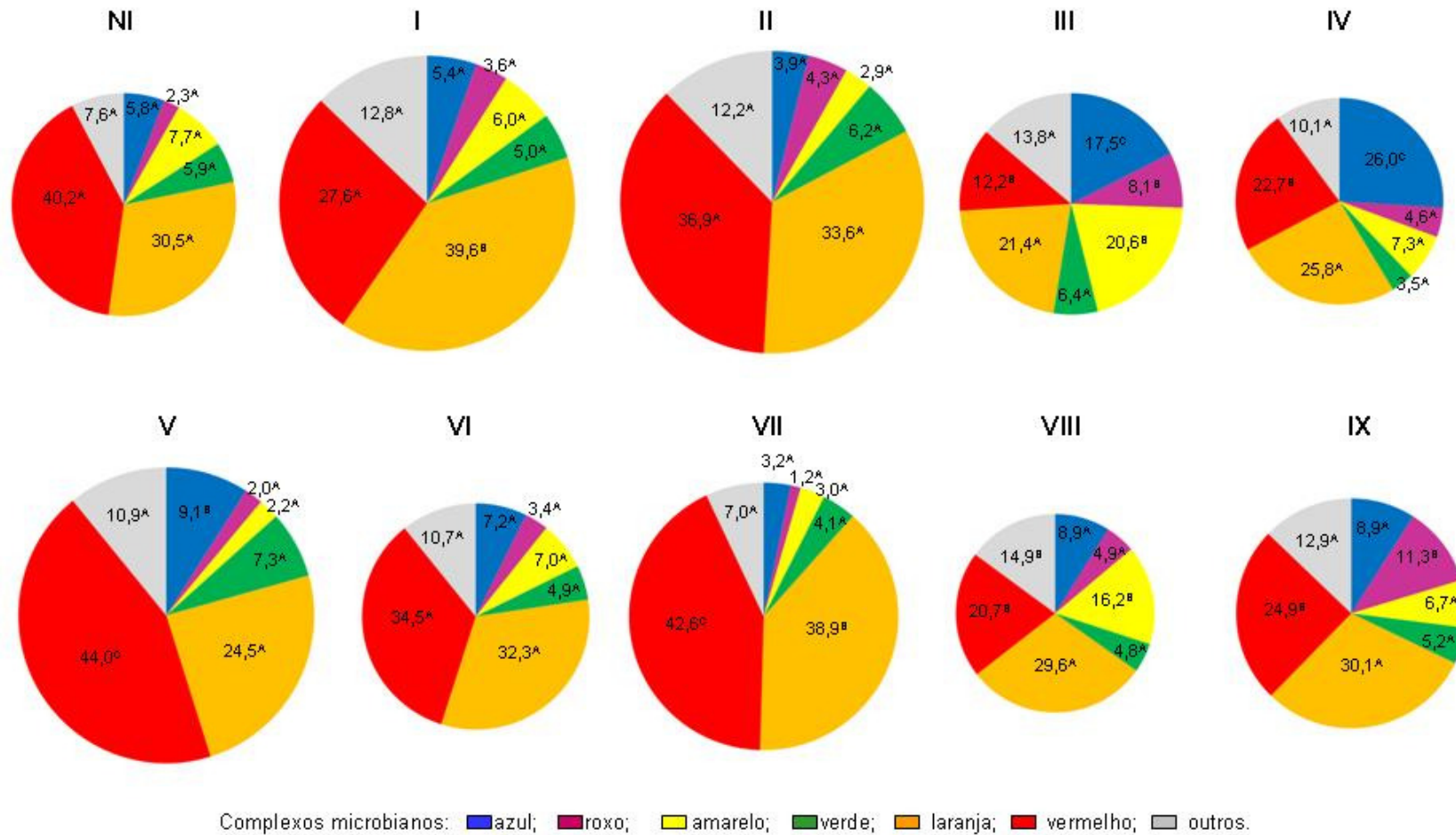


Figura 9. Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgingival nos dez grupos encontrados.

NI: Não incluído nos *clusters*. Teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$): Letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos.

5 DISCUSSÃO

O início e a progressão da doença periodontal estão associados à presença de microrganismos específicos no sulco gengival e/ou sítio periodontal. Os subprodutos derivados desse metabolismo microbiano também contribuem para o desenvolvimento da doença periodontal (PENNEL & KEAGLE, 1977; LOESCHE et al., 1985), já que estimulam uma resposta do sistema imunológico do hospedeiro. À medida que se estabelecem alterações inflamatórias no tecido gengival induzidas pelo biofilme, ocorrem alterações quantitativas e qualitativas da microbiota dental (LÖE et al., 1965). Na década de 90, com o desenvolvimento de técnicas imunológicas e de biologia molecular, foi possível a detecção mais precisa das espécies bacterianas que compõem os biofilmes orais e a relação dos diferentes perfis microbianos com as diferentes formas de periodontite (CHRISTERSSON et al., 1987; SOCRANSKY & HAFFAJJE et al., 1994b; ÁVILA-CAMPOS et al., 1999; GOMES et al., 2006).

A compreensão mais detalhada sobre a composição do biofilme supra e subgengivais associados ao periodonto saudável ou doente permitiu que se traçassem metas microbiológicas para as terapias periodontais. Esse foi um dos passos mais importantes no sentido de aperfeiçoar e, conseqüentemente, personalizar as diversas formas de tratamento em periodontia. Apesar de todo o conhecimento científico dos dias atuais ainda não é sabido o motivo que leva alguns pacientes sistemicamente saudáveis a responderem de maneira tão limitada às diversas formas de terapia periodontal (HAFFAJEE et al., 1997; ROSLING et al., 2001).

Primeiramente, é relevante a discussão do perfil clínico e microbiológico dos indivíduos selecionados. Os resultados desta investigação demonstraram que as médias de PS e NCI dos indivíduos participantes do estudo (Tabela 3) são compatíveis com a condição clínica de doença periodontal moderada-severa (FAVERI et al., 2006; MATARAZZO et al., 2008). Além disso, em relação aos achados microbiológicos (Figuras 5 e 6), *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* estavam em níveis e proporções elevados. Dados similares foram reportados por Lopez et al. (2004) e Colombo et al.

(2002), que também utilizaram a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para avaliar 40 espécies subgengivais em 26 chilenos e 25 brasileiros com periodontite crônica, respectivamente. O fato interessante é que essas duas populações, de brasileiros (COLOMBO et al., 2002 e o presente estudo) e de chilenos (LOPEZ et al., 2004), apresentaram proporções e níveis mais elevados destes patógenos em comparação com indivíduos norte-americanos (HAFFAJEE et al., 2004), mexicanos (XIMENEZ-FYVIE et al., 2006a,b) e suecos (HAFFAJEE et al., 2004). Essas divergências podem ser devidas a diferenças na microbiota específica de cada uma das populações destas regiões geográficas, ou podem estar relacionadas ao nível de infecção dos indivíduos incluídos nos vários estudos.

Outras espécies bacterianas também encontradas em grandes quantidades e proporções foram *F. nucleatum ss. nucleatum*, *F. nucleatum ss. polymorphum*, *F. nucleatum ss. vincentii*, *F. periodonticum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*. Essas espécies podem ser consideradas como possíveis patógenos periodontais e têm sido previamente associadas com a etiologia da doença periodontal (HAFFAJEE et al., 2004; van WINKELHOFF et al., 2005). *P. micra* foi encontrada em altas proporções em suecos (HAFFAJEE et al., 2004) e a *P. nigrescens*, em chilenos (LOPEZ et al., 2004), com periodontite crônica. Também é importante enfatizar que, de maneira geral, as contagens e proporções das espécies consideradas benéficas (complexos azul, roxo, amarelo e verde) encontraram-se reduzidas em comparação aos patógenos (complexos laranja e vermelho). Esse perfil de colonização foi descrito também para outras populações (COLOMBO et al., 2002; HAFFAJEE et al., 2006; LOPEZ et al., 2004; SOCRANSKY et al., 1998; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000).

Em relação ao perfil de similaridade, com base nos resultados deste estudo é possível sugerir que existem variações quantitativas e qualitativas no perfil de colonização bacteriana do ambiente subgengival entre diferentes indivíduos. Esta variação foi recentemente descrita por Teles et al. (2006) utilizando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e por outros autores que usaram cultura ou métodos moleculares (KAMMA et al., 1995; MOORE et al., 2000). O único artigo publicado em periódico que usou uma metodologia semelhante à aplicada nesta investigação foi o estudo de Teles et al. (2006).

Dados microbiológicos de 461 indivíduos com doença periodontal obtidos pela técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foram analisados por meio de um dendograma, resultando na formação de dez *clusters* a partir da aplicação do percentual de similaridade de 43%. Os autores sugeriram que os indivíduos podem possuir perfis de colonização microbiana diferenciados, indicando que diversos patógenos podem ser responsáveis pela etiologia da doença periodontal. Também é importante ressaltar a comparação dos resultados obtidos nos dois estudos (TELES et al., 2006 e o nosso). Considerando um percentual de similaridade de 45%, nove *clusters* foram formados após a análise dos dados desta investigação. Além disso, ambos os estudos encontraram alguns *clusters* com baixos níveis e proporções do complexo vermelho, o que não é compatível com a doença periodontal.

Outro ponto importante em relação aos resultados obtidos pode ser destacado quando se foca na terapia periodontal. Os principais objetivos da terapia periodontal são redução da profundidade de sondagem, do sangramento à sondagem e da supuração e aumento do nível de inserção. Os estudos científicos demonstram que esses resultados clínicos são atingidos quando os níveis, proporções e percentual de sítios colonizados por diferentes periodontopatógenos são efetivamente reduzidos. Adicionalmente, deve-se estabelecer uma nova comunidade microbiana no biofilme subgingival com níveis e proporções mais elevadas de microrganismos compatíveis com saúde periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994; TELES et al., 2006). Aparentemente, esse perfil microbiano compatível com saúde é mais facilmente instalado na cavidade oral quando a terapia empregada permite uma rápida e drástica redução dos patógenos, não somente nos sítios profundos, mas em toda a cavidade oral, incluindo sítios rasos e mucosas.

Neste contexto, a partir da terapia comumente empregada - raspagem e alisamento radicular (RAR) - alguns patógenos subgingivais não são removidos por estarem localizados em regiões fora do alcance da RAR, como algumas lesões de furca e dentina radicular (ADRIAENS & ADRIANES, 2004). Dessa forma, a busca de uma terapia periodontal mais eficaz é contínua, já que alguns pacientes ou sítios continuam a apresentar progressão de doença, mesmo após o tratamento convencional de RAR (HAFFAJEE et al.,

1997; ROSLING et al., 2001, XIMÉNEZ-FYVIE et al., 2000a; PETERSILKA et al., 2002).

Haffajee et al. (2006) apresentaram a resposta a diferentes terapias do mesmo grupo de indivíduo que tiveram o perfil microbiológico analisado anteriormente por Teles et al. (2006). Como esperado, as respostas terapêuticas foram diferentes e dependentes da composição da microbiota subgingival. Por exemplo, o grupo de indivíduos que mostraram as maiores perdas de inserção pós-terapia possuía a microbiota dominada por *A. naeslundii* I e II. Os indivíduos com altos níveis de *E. nodatum* também apresentaram respostas clínicas insatisfatórias. Por outro lado, esses dois grupos demonstraram baixos níveis de complexo vermelho.

É importante salientar que os estudos de associação de espécies microbianas com a doença periodontal representam apenas o primeiro passo no desenvolvimento de uma seqüência de evidências necessárias para definir os patógenos periodontais. Os resultados deste estudo sugerem a importância de investigações adicionais com foco na virulência dos microrganismos, resposta do hospedeiro, fatores de risco, efeito da supressão/eliminação das espécies na progressão da doença. Além disso, estudos longitudinais sobre terapia periodontal, com a inclusão de um número maior de indivíduos em cada um dos *clusters*, poderão fornecer informações valiosas em relação à resposta do hospedeiro frente às diversas combinações terapêuticas considerando a especificidade de seu perfil microbiológico.

6 CONCLUSÃO

* Existem diferenças no perfil de similaridade da microbiota subgingival de indivíduos com diagnóstico clínico de doença periodontal.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adriaens P, Edwards C, De Boever J, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentine of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol.* 1988; 59:493-503.

Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol 2000.* 2004; 36:121-145.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25(4):229-235.

Albandar JM, Olsen I, Gjermo P. Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs periodontitis. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48:415-423.

American Academy of Periodontology, The. 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions. *Ann of Periodontol.* 1999; 4(1):38.

Araujo MBW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurements using a constant-force electronic probe: Analysis of inter-and intraexaminer variability. *J Periodontol.* 2003 Dec; 74(12):1736-1740.

Ávila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Specific primer for AP-PCR identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol.* 1999 Nov; 26(11):699-704.

Baelun V, Fejerskov O, Manji F. Periodontal diseases in adult Kenyans. *J Clin Periodontol.* 1988; 15:445-452.

Booth V, Downes J, Van den Berg J, Wade WG. Gram-positive anaerobic bacilli in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 2004; 39:213-220.

Christersson L, Wikesjö U, Albin B, Zambon J, Genco R. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. *J Periodontol.* 1987; 58:540-545.

Christersson LA, Christer LF, Dunford RG, Zambon JJ. Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1992; 63:418-25. Clinical results. *J Clin Periodontol.* 2004; doc 10.1111/j. 1600-051X.2004.00605x.

Choi BK, Park SH, Yoo YJ et al. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. *J Periodontol* 2000; 71:1387-1394.

Colombo A, Teles RP, Torres MC et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002; 73:360-369.

Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1:926-932.

Darout IA, Skaug N, Albandar JM. Subgingival microbiota levels and their associations with periodontal status at the sampled sites in an adult Sudanese population using miswak or toothbrush regularly. *Acta Odontol Scand* 2003; 61: 115-122.

Dewhirst FE, Tamer MA, Ericson RE et al. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15:196-202.

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1988; 15:316-323.

Faveri M, Gursky LC, Feres M, Shibli JA, Salvador SL, de Figueiredo LC. Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2006; 33:819-828.

Gajardo M, Silva N, Gomez L et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 2005; 76:289-294.

Gomes SG, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R. Periodontal status in smokers and never-smokers: Clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2006; 77(9):1483-1490.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planning. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:767-776. (b)

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:324-334. (a)

Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effects of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol* 2000. 2006; 42:219-258.

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(11):996-1002.

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. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000*. 2006;42:7-12.

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 2004; 31:996-1002.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 1994; 5:78-111.

Hinrichs JE, Wolff LF, Pihlstrom BL, Schaffer EM, Liljemark WF, Bandt CL. Effects of scaling and root planning on subgingival microbial proportions standardized in terms of their naturally occurring distribution. *J Periodontol*. 1985; 56(4):187-94.

Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Predominant microbiota of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol Res*. 1995; 30(1):66-72.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003; 82:38-344.

LaGier MJ, Threadgill DS. Identification of novel genes in the oral pathogen *Campylobacter rectus*. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(5):406-412.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*. 1986; 13:431-445.

Löe H, Theilade E, Jensen SB, Schiott CR. Experimental gingivitis in man. III. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontol Res*. 1967; 2(4):282-299.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965; 36:177-187.

Loesche W, Kazor C. Microbiology and treatment of halitosis. *Periodontology 2000*. 2002; 28:256-79.

Loesche W, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol*. 1985; 56(8):447-456.

Loesche W. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J periodontol*. 1992; 63:1102-1109.

Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol*. 1985; 56(8):447-456.

Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev.* 1976;9:65-107.

Lopez NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004; 75: 717-725.

Lovdal A, Aron A, Waerhaugh J. Evidence of clinical manifestations of periodontal disease in light of oral hygiene and calculus formation. *J Am Dent Assoc.* 1958; 56:21-33.

Ludwig JA, Reynolds JF. *Statistical Ecology. A Primer on Methods and Computing.* New York: John Wiley & Sons, 1988:170.

Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res.* 1992; 71(7):1431-1438.

[Matarazzo F](#), [Figueiredo LC](#), [Cruz SE](#), [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.

Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:379-385.

Moore WEC, Moore LVH. The bacterial of periodontal disease. In *microbiology and Immunology of periodontal disease.* *Periodontol* 2000. 2000; 5:66:77.

Moore WEC. *Microbiology of periodontal disease.* *J Periodont Res,* 1987; 22: 335-41.

Papapanou PN, Neiderud AM, Papadimitriou A, Sandros J, Dahlen G. "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *J Periodontol* 2000; 71:885-897.

Pennel BM, Keagle JG. Predisposing factors in the etiology of chronic inflammatory periodontal disease. *J Periodontol.* 1977; 48(9):517-532.

Petersilka GM, Ehmke B, Flemmig TF. Anticicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontology* 2000. 2002; 28:56-71.

Rosenberg E, Evian CL, Listgarten MA. The composition of the subgingival microbiota after periodontal therapy. *J Periodontol.* 1981; 52:435-441.

Rosling B, Serino G, Hellstrom Mk, Socransky SS, Lindhe J. Longitudinal periodontal tissue alterations during supportive therapy: findings from subjects with normal and high susceptibility to periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001 Mar;28(3):241-249.

Russel AL. Epidemiology of periodontal disease. A review of the literature. *Int Dent J.* 1967; 17: 282-296.

Salari MH, Kadkhoda Z. Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis. *J Oral Sci* 2004; 46:157-161.

Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dellempijn-Kippuw N, Simon R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* 2000; 108:383-392.

Schei O, Waerhaugh J, Lovdal A, Aron A. Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J Periodontol.* 1959; 30:7-16.

Slots J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res.* 1977; 85:114-21.

Sneath PHA, Sokal RR. *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification.* San Francisco: WH Freeman & CO, 1973.

Socransky SS & Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38:35-87.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C., Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):134-144.

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

Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl.* 1994;(18):S684-5, 688-93; quiz S714-7.

Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol.* 1994b; 18:688-93.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2006; 42:180-218.

Thelaide E, Wright WH, Jensen SB, Løe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodont Res.* 1966; 1:1-13.

van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29:1023-1028.

van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005; 32:893-898.

van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29:1023-1028.

van Winkelhoff, AJ, Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol* 2000. 2005; 39:40-52.

Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Diversity and morphology of members of the phylum "Synergistetes" in periodontal health and disease. *Appl Environ Microbiol*. 2009 [Epub ahead of print]

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27:648-657.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000; 27(3):648-657.

Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruti E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2006; 33(12):869-877.

Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Guggenheim B, Gobel UB. *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:745-752.

Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Guggenheim B, Gobel UB. *Treponema amylovorum* sp. nov., a saccharolytic spirochete of medium size isolated from an advanced human periodontal lesion. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:842-845.

Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Moter A, Guggenheim B, Gobel UB. *reponema lecithinolyticum* sp. nov., a small saccharolytic spirochaete with phospholipase A and C activities associated with periodontal diseases. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49:1329-1339.

Wyss C, Dewhirst FE, Gmur R et al. *Treponema parvum* sp. nov., a small, glucuronic or galacturonic acid-dependent oral spirochaete from lesions of human periodontitis and acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:955-962.

Wyss C, Moter A, Choi BK et al. *Treponema putidum* sp. nov., a medium-sized proteolytic spirochaete isolated from lesions of human periodontitis and acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54:1117-1122.

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; 18:59–65.