



MESTRADO EM ODONTOLOGIA

ANTÔNIO CARLOS GARCIA DE OLIVEIRA

Caracterização do perfil microbiológico do biofilme subgingival de indivíduos com periodontite crônica e com saúde periodontal por meio do estudo de espécies bacterianas incomuns ou ainda não cultivadas.

Guarulhos

2011

ANTÔNIO CARLOS GARCIA DE OLIVEIRA

**Caracterização do perfil microbiológico do biofilme
subgingival de indivíduos com periodontite crônica e com
saúde periodontal por meio do estudo de espécies
bacterianas incomuns ou ainda não cultivadas.**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magda Feres

Guarulhos

2011

O48c Oliveira, Antonio Carlos Garcia de
Caracterização do perfil microbiológico do biofilme subgingival de indivíduos com periodontite crônica e com saúde periodontal por meio do estudo de espécies bacterianas incomuns ou ainda não cultivadas. / Antonio Carlos Garcia de Oliveira. Guarulhos, 2011.
p. 52 cm : il. ;

Dissertação (Mestrado em Odontologia área de concentração em Periodontia) - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri
Bibliografia: p.45-51

1. Biofilme subgingival 2. biologia molecular 3. gene *16S rRNA*
4. doença periodontal crônica 5. espécies ainda não cultivadas. I.
Título. II. Universidade Guarulhos.

DD 22st 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DO BIOFILME SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA E COM SAÚDE PERIODONTAL POR MEIO DO ESTUDO DE ESPÉCIES BACTERIANAS INCOMUNS OU AINDA NÃO CULTIVADAS" em sessão pública realizada em 27 de Maio de 2011, considerou o candidato ANTÔNIO CARLOS GARCIA DE OLIVEIRA aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

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



2. Profa. Dra. Adriana da Costa Ribeiro (USP)



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



Guarulhos, 27 de Maio de 2011.

“Dedico este trabalho ao esforço dos meus pais e da minha esposa, pois sem o apoio deles, esse sonho não se tornaria realidade”.

Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Antônio Dalvo e Conceição, 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.

A minha esposa Mileiny, por sempre estar do meu lado nas horas mais difíceis e principalmente pelos momentos que infelizmente não estava presente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo de Faveri e a minha co-orientadora Magda Feres, por ter me dado essa oportunidade de conhecer um pouco da vida acadêmica, pela paciência nos momentos mais difíceis, por me ajudar e orientar sempre que foi preciso e pela amizade que conquistamos ao longo desses anos de convivência.

Aos professores, Prof^a. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo, Prof^a. Dra. Poliana Mendes Duarte, Prof^a. Dra. Claudia Otta Tsuzuki, Prof^a. Dra. Marta Bastos e ao Prof. Dr. Jamil Awad Shibli, por terem contribuído para minha formação acadêmica, o meu muito obrigado.

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

Aos meus amigos de turma Luciana Ap. Gouveia de Cardoso, Tatiane Onuma, Isaac Araujo, por sempre me ajudarem nos momentos que precisei, e em especial ao Lucas Furtado, pelo apoio durante do trabalho clínico e laboratorial que não foi fácil. Muito obrigado.

Aos demais colegas e amigos de pós graduação que conheci durante o curso, pelo companheirismo e pela ajuda em todos esses anos de curso.

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.

À Cristina Zoucas pela colaboração e cuidado na organização da parte burocrática.

Aos alunos da iniciação científica da UnG, pelo apoio durante a fase clínica da pesquisa, deixo um recado jamais desistam de seus sonhos.

Aos demais funcionários pelo excelente funcionamento desta instituição.

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

A FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2009/12358-1)

O saber se aprende com os mestres.
A sabedoria, só com o corriqueiro da vida.

Cora Coralina

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência, proporção e níveis de espécies de bactérias ainda não cultivadas, bem como de espécies incomuns em indivíduos com periodontite crônica (PC) e com saúde periodontal (SP) por meio da técnica do “*RNA-oligonucleotide quantification*”. Foram selecionados 19 indivíduos com PC e 15 indivíduos com SP. Os parâmetros clínicos analisados foram profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção (NCI), presença ou ausência de placa visível, índice de sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração. Em ambos os grupos, amostras de biofilme subgengival foram coletadas da face mesial de todos os dentes presentes em 2 quadrantes contralaterais aleatoriamente selecionados. Essas amostras foram analisadas por meio de 39 sonda de DNA, incluindo sondas para espécies cultivadas e ainda não cultivadas usando a técnica “*RNA-oligonucleotide quantification*”. Em relação à avaliação clínica, o grupo PC apresentou maiores médias para todos os parâmetros clínicos mensurados em comparação ao grupo SP ($p < 0,05$). Indivíduos com PC mostraram um aumento significativo nos níveis, proporção e prevalência de *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Selenomonas sputigena*, *Filifactor alocis*, *Selenomonas* sp. CS002, *Prevotella* sp. AH125, *Peptostreptococcus* sp. DA014, enquanto *Actinomyces gerencseriae*, *Veillonella parvulla*, *Atopobium rimae*, *Rothia dentocariosa/mucilagionsa* e o filotipo *Actinomyces* sp. EO011 foram encontrados em níveis superiores em indivíduos com SP ($p < 0,05$). No grupo PC, dentre as espécies incomuns, *S. sputigena* e *F. alocis* apresentaram entre elas uma correlação de Pearson positiva superior a 0,5 ($p < 0,05$) e ambas se correlacionaram com o aumento da PS ($p < 0,05$). *Peptostreptococcus* sp. DA014 foi o único filotipo ainda não cultivado que apresentou uma correlação positiva com o aumento da PS ($r > 0,5$; $p < 0,05$). As espécies ainda não cultivadas representavam 42,8% e 44,1% da microbiota analisada nos grupos PC e SP, respectivamente. Os perfis de colonização microbiana de espécies incomuns e ainda não cultivadas em indivíduos com periodontite crônica difere marcadamente da observada em indivíduos com saúde periodontal.

Palavras chave: Biofilme subgengival, biologia molecular, gene *16S rRNA*, doença periodontal crônica, espécies ainda não cultivadas.

ABSTRACT

The aim of the present was to assess the prevalence, proportion and levels of not-yet-cultivated bacterial species, as well as unusual bacterial species in subjects with chronic periodontitis (ChP) and periodontal health (PH) by RNA-oligonucleotide quantification technique. Nineteen subjects with ChP and 15 PH subjects were selected. 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. In both groups, subgingival biofilm samples were collected from the mesial region of all teeth present in two contralateral quadrants randomly selected. These samples were analyzed using 39 different DNA probes, including probes for not-yet-cultivated bacterial taxa by RNA-oligonucleotide quantification technique. In relation to the clinical parameters, the group ChP presented the highest mean for all clinical parameters in comparison with PH group ($p < 0.05$). Subjects with ChP showed significantly higher mean counts, prevalence and proportion of *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Selenomonas sputigena*, *Filifactor alocis*, *Selenomonas* sp. EW084, *Prevotella* sp. AH125, *TM7* sp. AH040/BS002, *Tannerella* sp. BU063, *Peptostreptococcus* sp. DA014 e *Selenomonas* sp. EW084, while *Actinomyces gerencseriae*, *Veillonella parvula*, *Atopobium rimae*, *Rothia dentocariosa/mucilagionsa* and the phylotype *Actinomyces* sp. EO011 were found in higher mean counts and proportion in subjects with PH ($p < 0.01$). In ChP group, among unusual bacterial species, *S. sputigena* and *F. alocis* showed a positive Person correlation higher than 0.5 ($p < 0.05$) between them and both were correlated with PD increase ($p < 0.05$). *Peptostreptococcus* sp. DA014 was the only not-yet-cultivated bacterial species that showed a significant positive correlation with PD increase ($r > 0.5$, $p < 0.05$). Not-yet cultivated species accounted for about 42.8% and 44.1% of the microbiota in subgingival biofilm of subjects with ChP and PH, respectively. The microbial profiles of not-yet-cultivated bacterial species and unusual bacterial species in subjects with ChP differs markedly from that observed in subjects with PH.

Keywords: Subgingival biofilm, molecular biology, 16S rRNA gene, chronic periodontitis, not-yet-cultivated species.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA	16
3. PROPOSIÇÃO	17
4. MATERIAL MÉTODOS	18
4.1 Seleção da população.....	18
4.2 Avaliação clínica.....	18
4.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	19
4.3.1 Critérios de inclusão.....	19
4.3.2 Critérios de exclusão.....	19
4.4. Seleção dos sítios testes.....	20
4.4.1 Coleta das amostras de placa subgengival.....	20
4.5. Monitoramento microbiológico.....	20
4.5.1 Extração de ácidos nucleicos totais.....	21
4.5.2 Preparação das sondas de 16S rRNA.....	21
4.5.3 Deposição das amostras.....	21
4.5.4 Hibridização.....	23
4.5.5 Detecção dos sinais.....	24
4.6. Análise estatística.....	25
4.6.1 Dados clínicos.....	25
4.6.2 Dados microbiológicos.....	25
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO A	52

1 INTRODUÇÃO

A periodontite crônica é uma infecção que afeta indivíduos sistemicamente saudáveis caracterizada por uma perda de inserção clínica associada a uma destruição de tecido ósseo, acometendo pacientes de várias faixas etárias (TONETTI & MOMBELLI, 1999; ARMITAGE, 1999), todavia é mais comum em indivíduos adultos (BROWN & LÖE, 1993; AAP 1999; LINDHE, 1999). A periodontite crônica pode ser classificada em relação à extensão clínica da doença em localizada ou generalizada (ARMITAGE, 1999; 2004; LANG et al., 1999).

Os microrganismos presentes no biofilme dental (COSTERTON et al., 1999) localizado no sulco gengival e/ou bolsa periodontal assim como os subprodutos derivados do metabolismo microbiano são considerados agentes etiológicos primários das doenças periodontais (LOESCHE et al., 1985). A microbiota da periodontite crônica é complexa consistindo normalmente de bactérias anaeróbias Gram-negativas, tais como, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* e *Fusobacterium* species (LOSCHE et al., 1985; MULLALLY et al., 2000; KAMMA et al., 2001). O papel destas bactérias específicas tem sido extensivamente estudado em indivíduos adultos com saúde ou doença periodontal. Existe uma forte evidencia na literatura do papel destas espécies, principalmente *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *A. actinomycetemcomitans* na etiologia e progressão das doenças periodontais. Somente estes três microrganismos são considerados pela Academia Americana de Periodontia verdadeiros patógenos periodontais (ARMITAGE 1999, TELES et al., 2006). Normalmente estas espécies são encontradas em maior prevalência, proporção e níveis no biofilme supra e subgengival de indivíduos com periodontite do que em indivíduos com saúde periodontal. Estes dados estão bem fundamentados na literatura por estudos que utilizaram diferentes metodologias, tais como, cultura bacteriana (NEWMAN & SOCRANSKY, 1977; MOORE et al., 1991; ALI et al., 1992; LISTGARTEN, 1993; HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994; AAP, 1994; TSAI et al., 2003), reação em cadeia da polimerase (PCR) (ZAMBON & HARASZTHY,

1995; ÁVILA-CAMPOS et al., 1999; KUMAR et al., 2003), PCR quantitativo (KUBONIWA et al., 2004; MASUNAGA et al., 2010), sondas de DNA (MELVIN et al., 1994; ALBANDAR et al., 1997; LIU et al., 2003), técnicas imunológicas (LOESCHE 1986, FORGAS & NILIUS 1991, CHAVES et al., 2000; YANG et al., 2005) e sondas genômicas de DNA ("Checkerboard DNA-DNA Hybridization") (HAFFAJEE et al., 1997; CUGINI et al., 2000; HAFFAJEE et al., 2004; HAFFAJEE et al., 2005; FAVERI et al., 2009). Por outro lado, estudos demonstraram que estes microrganismos normalmente estão em níveis extremamente baixos em indivíduos com saúde periodontal (XIMENEZ-FYVIE et al., 2000; FAVERI et al., 2009).

Parece haver um consenso na literatura atual que não somente os microrganismos considerados periodontopatógenos clássicos como o *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* estariam correlacionados à periodontite, mas, sim, que outras espécies, inclusive algumas pouco estudadas ou ainda não identificadas, poderiam estar associadas com o início e evolução desta patologia (SAKAMOTO et al., 2000; PASTER et al., 2001; KUMAR et al., 2003; KUMAR et al., 2005). Por muito tempo, a análise da microbiota bucal foi dependente das técnicas convencionais de cultura, entretanto, técnicas de diagnóstico moleculares permitiram a identificação de cerca de 1200 espécies de bactérias na cavidade bucal, incluindo espécies indígenas e transitórias (PASTER & DEWHIRST, 2009). Assim sendo, calcula-se que na cavidade oral existam cerca de 620 espécies predominantes e que cerca de 35% destas ainda não foram cultivadas (PASTER & DEWHIRST, 2009).

De uma forma geral, como já dito anteriormente, inúmeros métodos têm sido utilizados para a identificação dos microrganismos bucais. As técnicas de microscopia de contraste de fase e de campo escuro podem demonstrar diferenças de tamanho e forma dos microrganismos presentes no biofilme dental. Porém, estes métodos microscópicos não diferenciam as espécies bacterianas (LOESCHE et al., 1985; BELTRAMI et al., 1987; OMAR et al., 1990; FURUICHI et al., 1996; DAHAN et al., 2004). Por outro lado, o método de cultura, considerado o "padrão-ouro" em microbiologia, é capaz de identificar diversos microrganismos presentes no biofilme dental, além de ser extremamente importante para a determinação da susceptibilidade microbiana

a diferentes antibióticos (NEWMAN & SOCRANSKY 1977; ALI et al., 1992; LIE et al., 1995). Entretanto, para determinadas espécies de difícil cultivo ou para espécies que ainda não foram cultivadas, faltam informações em relação ao papel das mesmas no processo etiológico das doenças periodontais.

Os primeiros dados descrevendo a grande diversidade e a presença de espécies incomuns ou espécies ainda não cultivadas no ambiente subgingival de indivíduos com periodontite foi publicado por PASTER et al. (2001). Os autores utilizaram métodos de clonagem e seqüenciamento 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 subgingival de bolsas periodontais), posterior amplificação da região *16S rDNA* por meio do PCR, clonagem dos produtos obtidos desta amplificação em *Escherichia coli* e o posterior seqüenciamento genético (OLSEN et al., 1986; HUGENHOLTZ & PACE, 1996; PASTER et al., 2001; KAZOR et al., 2003; KUMAR et al., 2005; FAVERI et al., 2008). PASTER et al. (2001) na época relataram que a comunidade bacteriana presente no ambiente subgingival consistia em aproximadamente 415 espécies baseados na análise de 2.522 clones *16S rRNA* e estimaram que o total da diversidade bacteriana na cavidade bucal seria de 500 espécies. Vale aqui ressaltar que os autores analisaram amostras de apenas 5 indivíduos com periodontite crônica. Posteriormente, KUMAR et al. (2005) selecionaram 15 indivíduos portadores de periodontite crônica e 15 indivíduos periodontalmente saudáveis. Amostras do biofilme subgingival de todos os dentes presentes no grupo saudável foram coletadas. No grupo com periodontite, foram coletas amostras de biofilme subgingival de todos os dentes com profundidade de sondagem (PS) ≥ 6 mm e de 4 sítios com PS ≤ 3 mm. A análise clonal foi realizada em 4.500 clones e um total de 274 espécies/filotipos foram identificados. Os autores identificaram que espécies do gênero *Peptostreptococcus*, *Filifactor*, *Megasphaera*, *Desulfobulbus*, *Campylobacter*, *Selenomonas*, *Deferribacteres* e *Dialister* estariam associadas com a periodontite crônica. Enquanto que por outro lado, espécies do gênero *Campylobacter*, *Abiotrophia*, *Gemella* e *Capnocytophaga* estariam associadas com a saúde periodontal. Os autores concluíram que outras espécies, além dos periodontopatógenos clássicos, poderiam estar

associadas com as periodontites, porém novos estudos seriam necessários para que tais espécies fossem definidas.

Recentemente, FAVERI et al. (2008) analisaram a diversidade bacteriana no ambiente subgengival de 10 indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada. Os autores observaram uma alta diversidade bacteriana na microbiota desses indivíduos e que espécies de *Selenomonas* poderiam estar envolvidas na etiologia da forma generalizada da periodontite agressiva. Assim sendo, investigações realizadas utilizando este modelo em amostras de biofilme subgengival de pacientes portadores de doença periodontal crônica (SAKAMOTO et al., 2000; PASTER et al., 2001; KUMAR et al., 2003; KUMAR et al., 2005) e de doença periodontal agressiva generalizada (FAVERI et al., 2008) demonstraram a presença de novos filotipos (espécies) de bactérias que poderiam estar associadas às periodontites. *Deferribacteres* sp. D084 e BH017, *Megasphaera* sp. BB166 e CS025, *TM7* sp. AH040, *TM7* sp. BS003, *Eubacterium* sp. BB167, *Prevotella* sp. DO027, *Eubacterium saphenum*, *Cryptobacterium curtum*, *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes*, *Dialister* sp. GBA27, *Selenomonas sputigena*, *Selenomonas* sp. EW084 e FNA3, *Selenomonas* sp. CS002, *Prevotella denticola*, *Porphyromonas* sp. BB136, *Peptostreptococcus* sp. AJ062, *Bacteroidetes* sp. AU126, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Solobacterium moorei*, *Brevundimonas diminuta*, *Veillonella atypica* e *Granulicatella adiacens* são alguns exemplos de espécies/filotipos que tem sido sugeridos como possíveis patógenos periodontais em diferentes estudos (PASTER et al., 2001; KUMAR et al., 2003; KUMAR et al., 2005; KUMAR et al., 2006; PASTER et al., 2006; FAVERI et al., 2008; COLOMBO et al., 2009). Por outro lado, espécies/filotipos tais como, *Veillonella* sp. X042, *Deferribacteres* sp. W090, *Bacteroidetes* sp. BU063, *Atopobium rimae*, *Atopobium parvulum*, e espécies do gênero *Streptococcus* e *Granulicatella* sp. são indicados com associação com a saúde periodontal (AAS et al., 2005; KUMAR et al., 2005).

Entretanto, uma grande limitação da técnica de clonagem e seqüenciamento 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 diferentes bibliotecas genômicas foram encontradas após a utilização do mesmo molde de DNA proveniente de amostra de biofilme subgingival. BONNET et al. (2002) demonstraram diferentes resultados quando variou 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 (ZOETENDAL et al., 2001; SCUPHAM et al., 2007).

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 seqüência genética específica, que são seqüências de ácidos nucléicos 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 seqüenciamento que é o fato de poder avaliar um grande número de amostras e espécies em um mesmo período de tempo. 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 (LISTGARTEN, 1976; HAFFAJEE et al., 1988; 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 nucleicos totais (DNA e RNA) da amostra e posterior hibridização com as sondas de oligonucleotídeos (similares ao da técnica do 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, que evidenciaram a grande diversidade de espécies presentes no biofilme subgengival de indivíduos com periodontite, 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-se questionamentos em relação a alguns resultados obtidos pela técnica. Desta forma, fazem-se necessários estudos que caracterizem o perfil microbiológico do biofilme subgengival relacionado a espécies bacterianas incomuns e ainda não cultivadas em um maior número de amostras e de indivíduos.

3 PROPOSIÇÃO

Comparar a prevalência, níveis e proporções de espécies bacterianas, incluindo espécies incomuns e espécies ainda não cultivadas em amostras de biofilme subgengival de indivíduos com periodontite crônica e com saúde periodontal por meio da técnica do “*RNA-oligonucleotide quantification*”.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da população

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Guarulhos (N^o 197/2009 – Anexo A).

Foram selecionados 19 indivíduos com periodontite crônica (grupo PC) e 15 indivíduos com saúde periodontal (grupo SP - 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 n^o 196/96).

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 & 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 & 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 crônica (PC)

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

- ≥ 30 anos de idade;
- Possuir no mínimo 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Mínimo de 30% de sítios apresentando PS e NCI ≥ 5 mm,

Indivíduos com saúde periodontal (SP)

- ≥ 30 anos de idade;
- Possuir no mínimo 20 dentes excluindo-se os terceiros molares;
- Não apresentar sítios com PS > 3 mm e concomitante NCI > 3 mm;
- 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 prévio; uso de antibióticos sistêmicos nos últimos seis meses; uso regular 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 PC e SP foram selecionados aleatoriamente 2 quadrantes contralaterais por meio de uma tabela de números aleatórios gerada por um programa de computador (IBM, SPSS 17.0, Nova York, EUA). Estes dois quadrantes deveriam apresentar no mínimo 9 dentes, caso não apresentassem os outros dois quadrantes eram selecionados. Foram coletadas amostras de biofilme subgengival da face mesial de todos os dentes presentes nestes quadrantes selecionados.

4.4.1 Coleta das amostras de placa subgengival

Em ambos os grupos, após a remoção da placa supragengival a coleta de amostras de biofilme subgengival foi feita com curetas Gracey 11/12 do tipo mini-five (HuFriedy, USA), posicionadas na porção mais apical dos sítios selecionados. As amostras foram depositadas em tubos de polipropileno de 1,5 ml contendo 100µl de solução TE RNase-free (10mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). O material coletado foi armazenado à temperatura de -80°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 Epicentre Masterpure DNA & RNA Purification (Epicentre, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, as superfícies das bancadas e aparatos foram tratadas com substância inibidoras de ribonucleases (RNaseAWAY® – Invitrogen, San Diego, CA, USA) para minimizar o risco de degradação dos ácidos nucleicos. O tubo contendo a amostra foi retirado do freezer -80°C e mantido em gelo por 10 minutos para descongelamento. O tubo coletor foi agitado no vortex por 1 minuto e a solução foi transferida para um novo tubo. Para a lise do material coletado, adicionou-se 1,0µL de solução de proteinase K (50µg/µL) aos 100µL da solução de TE da amostra, e posteriormente incubado a 65°C, por 15 minutos. As amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos, foi adicionado 175µL MCP reagente para precipitação de proteínas, centrifugação por 10 minutos a 12°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde

foi adicionado 500 μL de isopropanol, os tubos foram agitados por 2 minutos e após isso ocorreu nova centrifugação por 10 minutos a 4°C . O isopropanol foi descartado e os pellets foram lavados duas vezes com ethanol 70%. Os pellets foram secos por 10 minutos e após ressuspensos em 25 μL TE e armazenado à -80°C .

4.5.2 Preparo das sondas de *16S rRNA*

As sondas de oligonucleotídeos para as espécies que já foram cultivadas (Tabela 1) e para as espécies ainda não cultivadas (Tabela 2) possuem cerca 18-22 nucleotídeos e mínimas estruturas secundárias na região conservada do gene *16S rRNA* para organismos procariontes. A seqüência das sondas foram gentilmente cedidas 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 seqüências complementares às sondas. As sondas foram marcadas com digoxigenina utilizando um kit específico para oligonucleotídeos, segundo as especificações do fabricante na concentração final de $4,5\text{pM}/\mu\text{L}$ (DIG Oligonucleotide 3'- End labeling kit, 2nd Generation – Roche, Indianápolis, IN, USA). De uma forma geral, em um tubo estéril de $200\mu\text{L}$ foi adicionado 100pM da sonda para um volume final de $10\mu\text{L}$. Posteriormente, $4\mu\text{L}$ de uma solução tampão, $4\mu\text{L}$ de uma solução 5mM de CoCl_2 , $1\mu\text{L}$ de uma solução $0,05\text{mM}$ de DIG-ddUTP e $1\mu\text{L}$ da enzima transferase ($20\text{U}/\mu\text{L}$) foram adicionados. Esta solução foi incubada 37°C por 30 minutos. Posteriormente, a solução foi retirada e colocada em gelo por 5 minutos e $2\mu\text{L}$ de uma solução $0,2\text{mM}$ EDTA (pH 8.0) foi adicionada para interromper a reação.

4.5.3 Deposição das amostras

Após a quantificação da concentração dos ANT das amostras (NanoDrop, Thermo Scientific, USA) as alíquotas de $25\mu\text{L}$ contendo todo o ANT obtido de cada amostra foram adicionadas a $90\mu\text{L}$ de glutaraldeído 2% (Ted Pella, Redding, CA, USA) e $910\mu\text{L}$ de 6X de tampão salina citrato (SSC) totalizando o

volume de aproximadamente 1.025µL que foi depositado diretamente em membrana de nitrocelulose (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA) de 15 x 15 cm posicionada no aparato MiniSlot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, USA). 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 0,004pM e 0,04pM de cada seqüência, correspondendo a 10⁵ e 10⁶ células, respectivamente (TELES et al. 2011). Foram adicionados aos controles alíquotas de 90µL de glutaraldeído 2% (Ted Pella, Redding, CA, USA) e 910µL de 6X de tampão salina citrato (SSC) para obtenção de um volume de aproximadamente 1000µl, 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. Seqüências das sondas de oligonucleotídeos utilizadas para espécies cultivadas.

Espécies/filotipos	Seqüências (5' - 3')	Controle (5' - 3')
<i>Tannerella forsythia</i>	TTGCGGGCAGGTTACATA	TATGTAACCTGCCCGCAA
<i>Selenomonas sputigena</i>	CCGTCACCCAAACTCAAT	GGCAGTGGGTTTGAGTTA
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	TCAGTCGCAGTATGGCAA	TCAGTCGCAGTATGGCAA
<i>Treponema denticola</i>	CTACCGTCATCAAAGAAGC	GCTTCTTTGATGACGGTAG
<i>Dialister pneumosintes</i>	TCACCACAAACCCTTTTCG	CGAAAGGGTTTGTGGTGA
<i>Filifactor alocis</i>	GGCTCATCTTTGTCCACT	AGTGGACAAAGATGAGCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	TTAAAGGTCCGCCTACGT	ACGTAGGCGGACCTTTAA
<i>Fusubacterium nucl. ssp. polymorphum</i>	GTTGTCCCTATCTGTGAG	CTCACAGATAGGGACAAC
<i>Eubacterium infirmum</i>	GTCCGAAGAAGAATCCGAT	ATCGGATTCTTCTTCGGAC
<i>Solobacterium moorei</i>	CAGCTTTGCAAGGGATGT	ACATCCCTTGCAAAGCTG
<i>Eubacterium nodatum</i>	AACCGAGCTTTCAGTGGGA	TCCCACTGAAAGCTCGGTT
<i>Rothia dentocariosa/mucilaginoso</i>	GCGGAGATTGGTCGTAT	ATACGACCAATCTCCGC
<i>Streptococcus sanguinis</i>	CAATAATCAATTTTATGCGGT	ACCGCATAAAATTGATTATTG
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	TATCGGCACCGGAGTTTT	AAAACCTCCGGTGCCGATA
<i>Veillonella parvula</i>	GGTACCGTCAATCCTTCT	AGAAGGATTGACGGTACC
<i>Atopobium rimae</i>	GCCACATTGAAGTATCGG	CCGATACTTCAATGTGGC
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCCAGGACCCACAAAAG	CTTTTGTGGGTCCTGGAT
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	ACCCAGAAAGCCCGTT	AACGGGCTTCTGGGGT
<i>Campylobacter rectus/consisus</i>	TATAGCCTCATCCTACACCG	CGGTGTAGGATGAGGCTATA
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	TCTTCCGTCTTTCCCAT	ATGGGGAAAGACGGAAAGA

Tabela 2. Seqüências das sondas de oligonucleotídeos utilizadas para espécies ainda não cultivadas.

Espécies/filotipos	Seqüências (5' - 3')	Controle (5' - 3')
<i>Universal 16S rRNA</i>	CTGCTGCCTCCCGTAGG	GACGACGGAGGCATCC
<i>Actinomyces sp. EPO11</i>	CCACAAAAAAGGAGCAGG	CCTGCTCCTTTTTTGTGG
<i>Campylobacter sp. Cluster I (a)</i>	GTGCTTATTCCTTGGGTAC	GTACCCAAGGAATAAGCAC
<i>Capnocytophaga sp. BB167</i>	GCCGTGCTCTTATACCAT	ATGGTATAAGAGCACGGC
<i>Porphyromonas sp. Cluster I (b)</i>	ATGCCCTATCCAAGTGTA	TACTCTGGATAGGGCAT
<i>Eubacterium sp. BB142</i>	AAGCTCGTCTATAACCGC	GCGGTTATAGACGAGCTT
<i>Peptostreptococcus sp. DA014</i>	ATTAATCGCGGTTTCCCAC	GTGGGAAACCGCGATTAAT
<i>Prevotella sp. DO027</i>	CCCAAGCTTAACCTGATG	CATCAGGTTAAGCTTGGG
<i>Prevotella sp. AH125</i>	ACGCGTGTCCCTCTTTAT	ATAAAGAGGGACACGCGT
<i>Tannerella sp. BU063</i>	TCTGTTGTAGGTAGGTTGC	GCAACCTACCTACAACAGA
<i>TM7 sp. AH040/BS003</i>	GGCACTAATTGGTTTCCC	GGGAAACCAATTAGTGCC
<i>Desulfobulbus sp. R004</i>	TGTTATTCGCTGCCTTGCA	TGCAAGGCAGCGAATAACA
<i>Megasphaera sp. CS025</i>	TCTACGCCCTTCACTCAA	TTGAGTGAAGGGCGTAGA
<i>Bacteroidetes sp. AU126</i>	AGATGCCTCTTCCGTTTAC	GTAAACGGAAGAGGCATCT
<i>Veillonella sp. Cluster I (c)</i>	AATCCCCTCCTTCAGTGA	TCACTGAAGGAGGGGAT
<i>Deferribacteres sp. W090</i>	GTGTTACCACTTCACGAC	GTCGTGAAGTGGTAACA
<i>Streptococcus sp. Cluster I (d)</i>	AGCCGTCCCTTTCTGGT	ACCAGAAAGGGACGGCT
<i>Selenomonas sp. CS002</i>	AATACCGAATGTTGCGCC	AATACCGAATGTTGCGCC
<i>Selenomonas sp. EW084</i>	CCGTCATTACAGAGCACT	GGCAGTAATGTCTCGTGA

a) *Campylobacter sp. Cluster I* = *C. showae*; *C. curvus*; *C. rectus*; *Campylobacter sp. 763/ 580/ 748*

b) *Porphyromonas sp. Cluster I* = *Porphyromonas sp. CW034/ EP003/ BR037*

c) *Veillonella sp. Cluster I* = *Veillonella sp. X042 /X002/ BU083/ AA050/ X031*

d) *Streptococcus cluster I* = *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oralis*.

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%, 5X SSC, caseína 1% (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 5X reagente de Denhardt (Sigma, St. Louis, MO, USA), 25mM 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” (Immunitics, Cambridge, MA, USA) com as linhas

contendo o DNA fixado perpendicularmente às 45 canaletas do “Miniblotter”. Cada sonda na concentração inicial de 4,5 μM / μL foi diluída na solução de hibridização (UltraHyb™ Oligo hybridization Buffer- Ambion, Austin, TX, USA) para obtenção de concentração final de 2 μM a 60 μM , e estas são 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 estrigente (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 de ácido maléico. Posteriormente, as membranas foram submetidas à lavagem em solução bloqueadora (270ml de 0,1M ácido maléico e 30ml de caseína) durante 1 hora. Para detecção das sondas marcadas, a membrana foi depositada em solução contendo 50ml de solução bloqueadora acrescida de 8 μl 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 0,1M ácido maléico; 3M NaCl; 0,2M NaOH; 0,3% Tween 20; pH 8,0; 3X/15 minutos, e 1X / 5 minutos em 200ml de uma solução contendo 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, UK), 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 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, EUA) que tem a capacidade de medir a intensidade de pixels de cada sinal e compará-lo com os sinais controles.

4.6 Análise estatística

4.6.1. Dados clínicos

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. Dados microbiológicos

Os dados microbiológicos foram expressos de 3 maneiras: contagens (níveis), proporção e percentual de sítios colonizados (prevalência). 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, proporção 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 PC foram avaliadas pelo teste Friedman. Testes de correlação de Pearson foram realizados na tentativa de correlacionar níveis das espécies estudadas entre elas isoladamente ou com os parâmetros clínicos periodontais avaliados.

A significância estatística foi estabelecida em 5%.

5 RESULTADOS

As características epidemiológicas e as médias dos parâmetros clínicos observados nos dois grupos experimentais estão apresentadas na Tabela 3. Os grupos PC e SP foram homogêneos em relação à idade e em relação à distribuição do gênero (Teste Qui-quadrado, $p < 0,05$). Indivíduos do grupo PC apresentaram médias estatisticamente superiores para todos os parâmetros clínicos avaliados em comparação ao grupo SP (Teste Mann-Whitney, $p < 0,001$).

Tabela 3. Média ($\pm dp$) das características demográficas e dos parâmetros clínicos nos grupos periodontite crônica (PC) e com saúde periodontal (SP).

Variáveis	SP (n=15)	PC (n=19)	p-valor
Idade (anos)	37,0 \pm 5,0	42,8 \pm 5,5	NS
Gênero (M/F) [‡]	8/7	8/11	NS
Profundidade de Sondagem (mm)*	2,1 \pm 0,2	4,3 \pm 0,8	<0,001
Nível clínico de inserção (mm)*	2,1 \pm 0,2	5,0 \pm 1,4	<0,001
% sítios com			
Placa visível*	30,0 \pm 10,0	80,0 \pm 17,0	<0,001
Índice gengival*	0,0 \pm 0,0	70 \pm 30,0	<0,001
Sangramento à sondagem*	6,0 \pm 10,0	90,0 \pm 10,0	<0,001
Supuração*	0,0 \pm 0,0	10,0 \pm 10,0	<0,001

*m=masculino; f=feminino; ‡Teste Qui-quadrado; *Teste Mann-Whitney; NS=não significante.*

A Tabela 4 apresenta uma descrição detalhada do número de amostras de biofilme subgengival avaliadas e a média dos parâmetros clínicos destas amostras para ambos os grupos experimentais. No presente estudo, 384 amostras de biofilme subgengival foram avaliadas em ambos os grupos, sendo 202 e 182 amostras para os grupos PC e SP, respectivamente. No grupo PC, foram avaliadas em média 10,6 \pm 1,6 amostras por indivíduo e no grupo SP foram avaliadas 12,1 \pm 1,9 amostras (Teste Mann-Whitney, $p > 0,05$). Os parâmetros clínicos dos sítios selecionados do grupo PC apresentaram médias estatisticamente superiores para todos os parâmetros clínicos avaliados em comparação ao grupo SP (Teste Mann-Whitney, $p < 0,001$). É interessante observar que as médias de PS e NCI dos sítios onde as amostras foram

realizadas foram semelhantes às médias destes parâmetros para a avaliação da boca toda (Tabela 3).

Tabela 4. Média (\pm dp) dos parâmetros clínicos dos sítios selecionados para as amostras avaliadas nos grupos periodontite crônica (PC) e com saúde periodontal (SP).

Variáveis	SP (n=15)	PC (n=19)	p-valor
Total de amostras	182	202	NS
Média de amostras avaliadas	12,1 \pm 1,9	10,6 \pm 1,6	NS
Profundidade de sondagem (mm)*	2,1 \pm 0,2	4,2 \pm 0,8	< 0,0001
Nível Clínico de inserção (mm)*	2,1 \pm 0,2	4,5 \pm 1,4	< 0,0001
% sítios com			
Placa visível*	30,0 \pm 10,0	80,0 \pm 30,0	< 0,0001
Índice gengival*	0,0 \pm 0,0	70,0 \pm 40,0	< 0,0001
Sangramento à sondagem*	0,0 \pm 1,0	90,0 \pm 10,0	< 0,0001
Supuração*	0,0 \pm 0,0	5,0 \pm 5,0	< 0,0001

**Teste Mann-Whitney; NS=não significante.*

As Figuras 1 e 2 mostram respectivamente a estimativa da média da contagem ($\times 10^5$) e a proporção das espécies bacterianas avaliadas nas amostras de biofilme subgengival de 15 indivíduos PS e 19 indivíduos com PC. Ambos os gráficos foram ordenados de forma decrescente para a contagem (Figura 1) e para a proporção (Figura 2) das espécies bacterianas presentes no grupo SP. As espécies bacterianas encontradas em maiores níveis e também em maiores proporções nos indivíduos com periodontite crônica foram *S. sputigena*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *F. alocis*, bem como espécies ainda não cultivadas *Prevotella* sp. AH125, *TM7* sp. AH040/BS002, *Tannerella* sp. BU063, *Peptostreptococcus* sp. DA014 e *Selenomonas* sp. EW084. Por outro lado, dentre as espécies avaliadas que apresentaram-se ao mesmo tempo em níveis e proporções significativamente elevados nos indivíduos do grupo SP foram *R. dentocariosa/mucilaginoso*, *S. sanguinis*, *A. rimae* e *Actinomyces* sp. EO011. Além disso, espécies/filotipos avaliadas pela sonda *Veillonella* sp. Cluster I e *Campylobacter* sp. Cluster I apresentaram níveis significativamente elevados nos indivíduos com periodontite crônica, bem como *F. nucleatum ss polymorphum*, *P. endodontalis*, *C. rectus/consisus*,

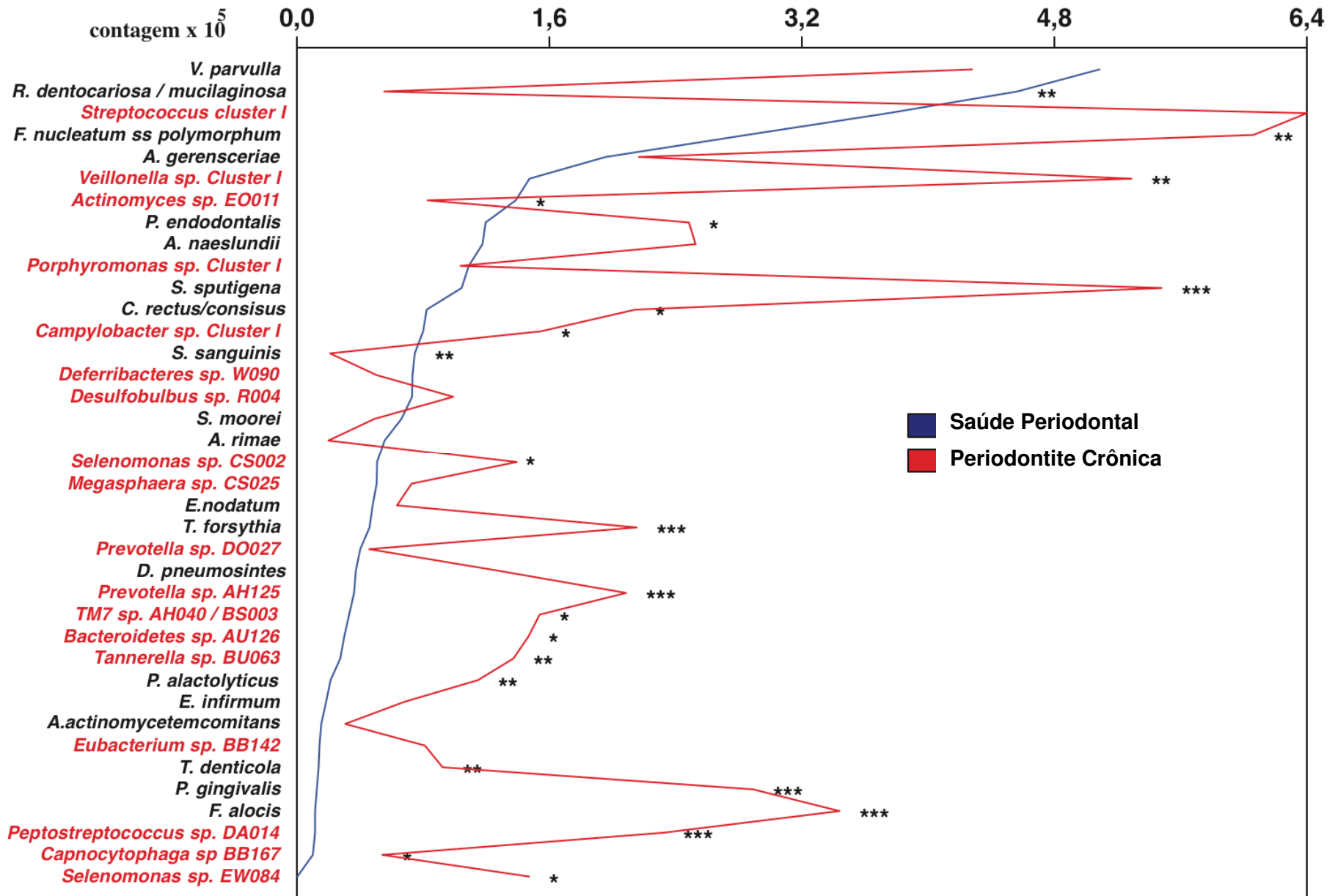


Figura 1. Estimativa da média de contagem ($\times 10^5$) das espécies bacterianas avaliadas nas amostras de biofilme subgingival de 15 indivíduos com saúde periodontal e 19 indivíduos com periodontite crônica. As espécies/filótipos ainda não cultivadas estão destacadas em vermelho.

Teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

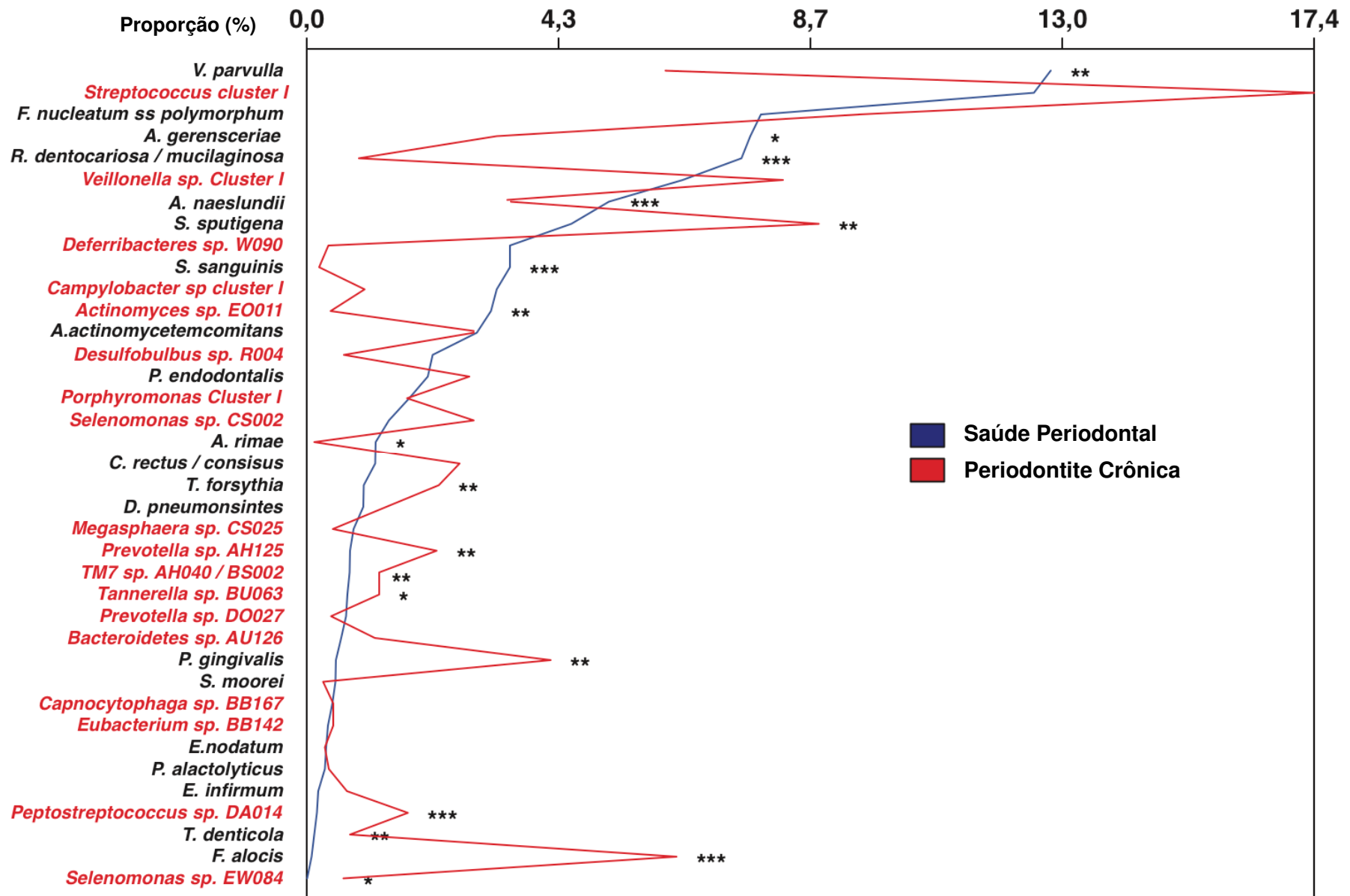


Figura 2. Média da proporção das espécies bacterianas avaliadas nas amostras de biofilme subgengival de 15 indivíduos com saúde periodontal e 19 indivíduos com periodontite crônica. As espécies/filotipos ainda não cultivadas estão destacadas em vermelho.

Teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Selenomonas sp. CS002, *Bacteroidetes* sp. AU126, *P. alactolyticus* e *Capnocytophaga* sp. BB167 (Figura 1). *V. parvulla*, *A. gerensceriae* e *A. naeslundii* apresentaram-se em proporções significativamente elevadas nos indivíduos com saúde periodontal (Figura 2).

A estimativa média da contagem ($\times 10^5$) e a proporção média das espécies bacterianas avaliadas nas amostras subgengivais de 15 indivíduos com SP em comparação com as amostras coletadas de sítios com $PS \leq 3\text{mm}$ dos indivíduos do grupo PC estão apresentadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Dez espécies e/ou filotipos apresentaram níveis e proporções significativamente superiores nas bolsas rasas dos indivíduos com PC em comparação aos indivíduos com SP, sendo que dentre tais espécies estão incluídas o *F. nucleatum* sp. *polymorphum*, *S. sputigena*, *T. forsythia*, *D. pneumosintes*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. alocis*, além das espécies ainda não cultivadas *Selenomonas* sp. CS002, *Prevotella* sp. DO027 e *TM7* sp. AH040 / BS002. *Actinomyces* sp. EO011 foi a única espécie/filotipo que apresentou-se em níveis e proporção significativamente superior no grupo SP em comparação aos indivíduos do grupo PC ($p < 0,0001$).

Com o objetivo de fazer uma avaliação mais detalhada do perfil microbiológico os sítios do grupo PC foram subdivididos em 3 categorias de PS: rasas ($\leq 3\text{mm}$), intermediárias (4-6mm) e profundas ($\geq 7\text{mm}$). A análise estatística foi repetida, ou seja, os dados das 3 categorias de PS foram computados para cada indivíduo e posteriormente comparados (Figura 5). Onze espécies e/ou filotipos foram encontrados em níveis significativamente superiores nas bolsas profundas em comparação a bolsas rasas e/ou intermediárias. Dentre estas espécies encontramos as espécies já cultivadas *S. sputigena*, *P. endodontalis*, *F. alocis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *D. pneumosintes* e *E. nodatum* e os filotipos ainda não cultivados *Prevotella* sp. AH125, *Peptostreptococcus* sp. DA014, *TM7* sp. AH040/ BS002 e *Porphyromonas* sp. Cluster I.

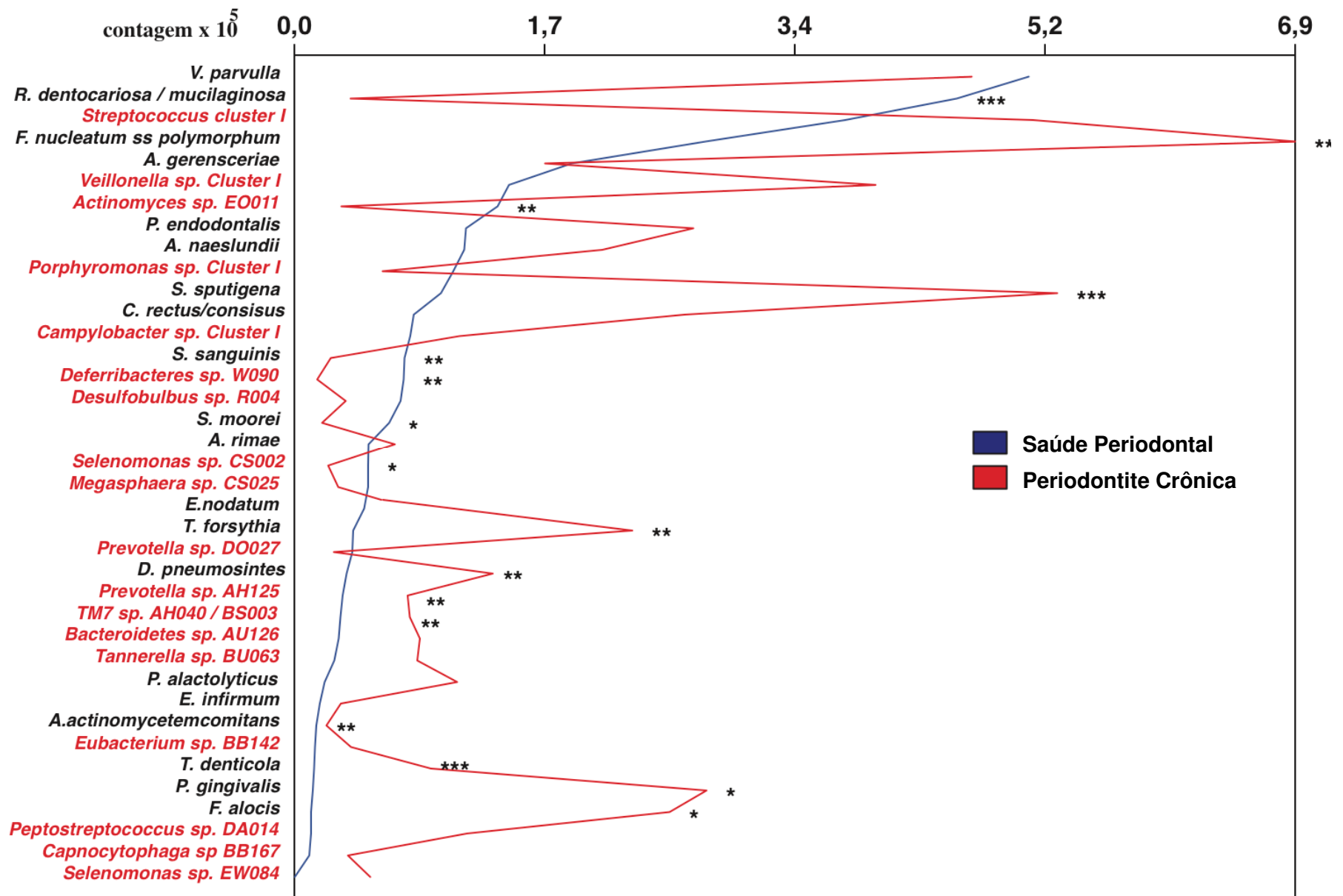


Figura 3. Estimativa da média de contagem ($\times 10^5$) das espécies bacterianas avaliadas nas amostras de biofilme subgingival de sítios com profundidade de sondagem ≤ 3 mm em 15 indivíduos com saúde periodontal e 19 indivíduos com periodontite crônica. As espécies/filotipos ainda não cultivadas estão destacadas em vermelho.

Teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

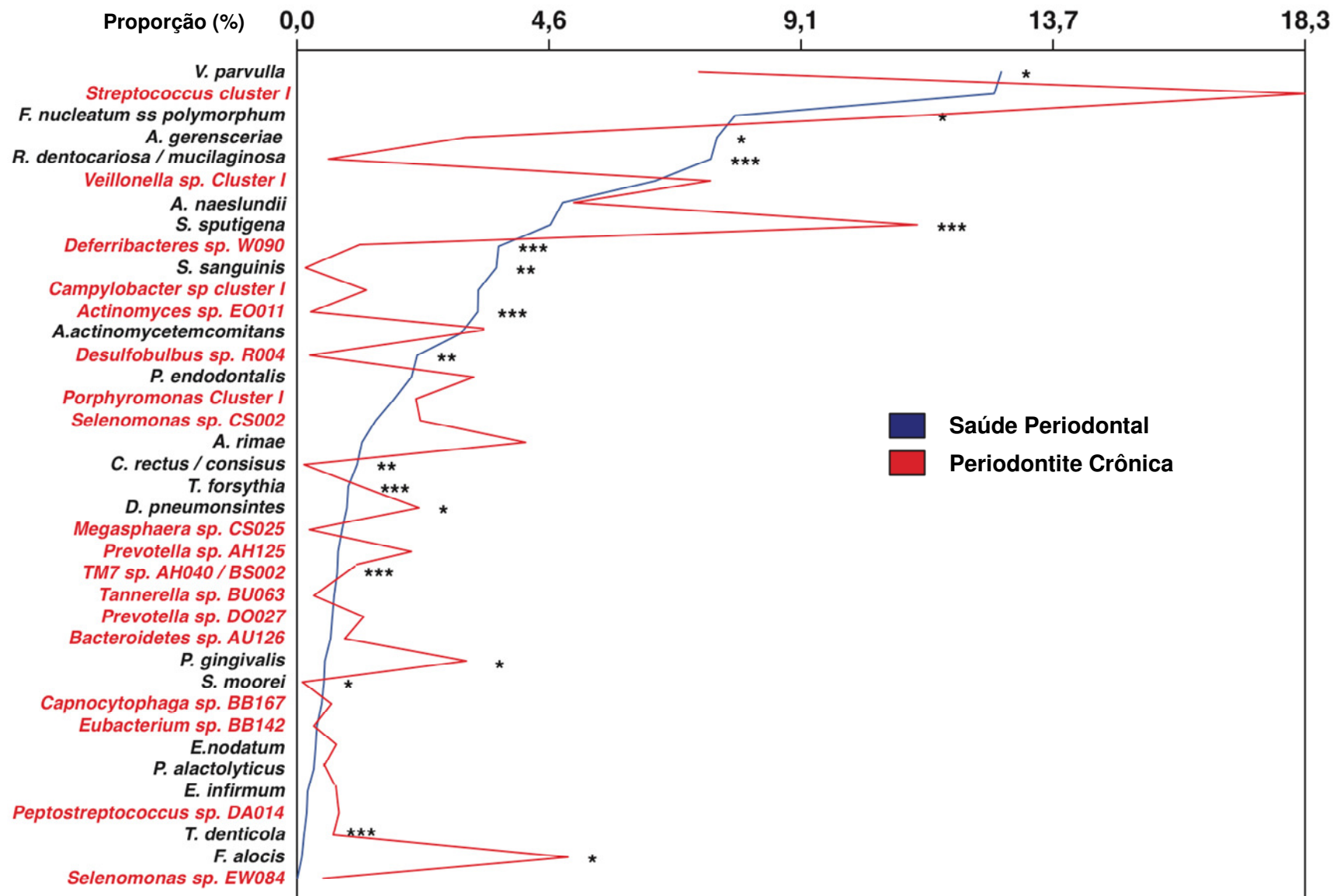


Figura 4. Média da proporção das espécies bacterianas avaliadas nas amostras de biofilme subgingival de sítios com profundidade de sondagem $\leq 3\text{mm}$ em 15 indivíduos com saúde periodontal e 19 indivíduos com periodontite crônica. As espécies/filotipos ainda não cultivadas estão destacadas em vermelho.

Teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

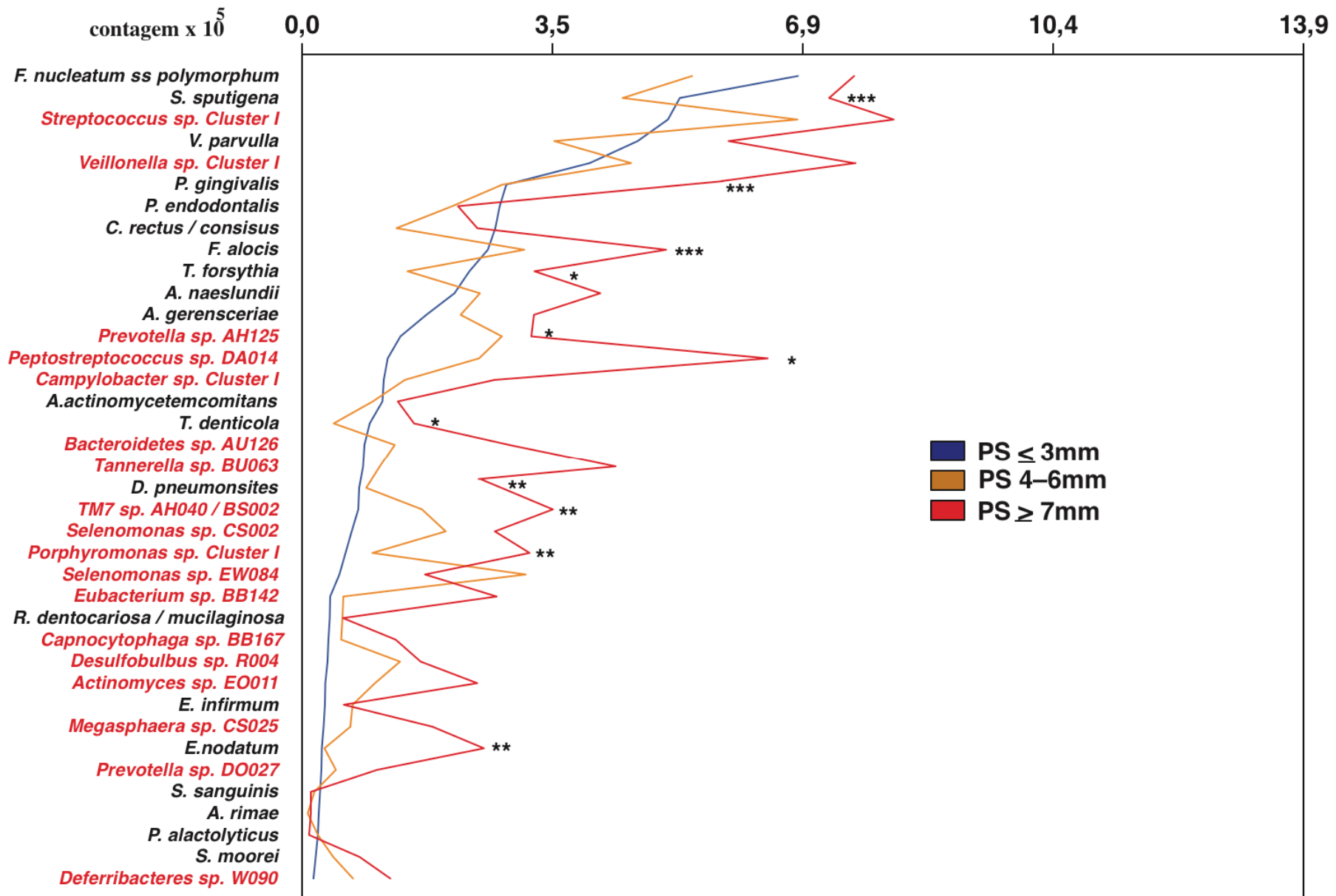


Figura 5. Estimativa da média de contagem (x 10⁵) das espécies bacterianas avaliadas nas amostras de biofilme subgingival de sítios com profundidade de sondagem ≤3mm, 4-6mm e ≥7mm em 19 indivíduos com periodontite crônica. As espécies/filotipos ainda não cultivadas estão destacadas em vermelho.
 Teste de Mann-Whitney, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

A tabela 5 apresenta a média de sítios colonizados pelas espécies/filotipos estudadas nas amostras de biofilme subgengival de indivíduos com PC e SP. As espécies foram organizadas de forma descendente para o perfil de colonização do grupo SP. Treze espécies apresentaram diferenças estatísticas nas médias de sítios colonizados entre os grupos PC e SP. *Actinomyces* sp. EO011 foi a única espécie que apresentou uma média de colonização estatisticamente superior no grupo SP (31 ± 21) em comparação ao grupo PC (7 ± 11 ; $p=0,001$). *S. sputigena*, *Veillonella* sp. Cluster I, *P. endodontalis*, *T. forsythia*, *Prevotella* sp. AH125, *Selenomonas* sp. CS002, *Prevotella* sp. DO027, *P. gingivalis*, *Bacteroidetes* sp. AU126, *T. denticola*, *Peptostreptococcus* sp. DA014, *Selenomonas* sp. EW084 apresentaram-se uma prevalência significativamente superior no grupo PC em comparação aos indivíduos do grupo SP.

A Figura 6 apresenta a proporção de espécies cultivadas e ainda não cultivadas presentes no biofilme subgengival dos indivíduos do grupo PC e SP. A área do gráfico foi ajustada para refletir a diferença na contagem total de bactérias presentes nas amostras avaliadas. A contagem total de todas as espécies avaliadas pelo presente estudo foi de $34,1 \times 10^5$ para o grupo SP e $71,5 \times 10^5$ para o grupo PC, sendo que estes resultados foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p<0,001$). As espécies cultivadas representavam cerca de 57,2% e 55,9% da microbiota presente no biofilme subgengival de indivíduos do grupo PC e SP, respectivamente. Por outro lado, 42,8% e 44,1% da microbiota era composta por espécies ainda não cultivadas nos grupos PC e SP. Nenhuma diferença estatística foi observada na proporção de espécies ainda não cultivadas e cultivadas entre os grupos experimentais ($p>0,05$).

As correlações existentes entre as espécies cultivadas e ainda não cultivadas avaliadas no presente estudo estão apresentadas na Figura 7. Algumas correlações positivas interessantes foram observadas, como as relações existentes entre as espécies do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, $p<0,05$). *S. sputigena* apresentou correlações positivas acima de 0,5 com *D. pneumosintes* ($p<0,05$), *P. gingivalis* ($p<0,001$) e *F. alocis* ($p<0,01$). Podemos observar pela Figura 7, que existem maior número de correlação positiva acima de 0,5 para o grupo de espécies ainda não cultivadas

Tabela 5. Média (\pm dp) de sítios colonizados pelas espécies nas amostras de biofilme avaliadas nos grupos periodontite crônica (PC) e com saúde periodontal (SP).

Espécies / Filotipos	Grupos		*p-valor
	SP (n=15)	PC (n=19)	
<i>A. gerencseriae</i>	70 \pm 33	52 \pm 28	NS
<i>Streptococcus sp. Cluster I</i>	63 \pm 33	77 \pm 20	NS
<i>V. parvulla</i>	62 \pm 22	56 \pm 30	NS
<i>F. nucleatum ssp. polymorphum</i>	53 \pm 25	69 \pm 18	NS
<i>S. sputigena</i>	50 \pm 25	75 \pm 25	0,008
<i>A. naeslundii</i>	49 \pm 26	49 \pm 21	NS
<i>R. dentocariosa / mucilaginoso</i>	43 \pm 24	28 \pm 22	NS
<i>Veillonella sp. Cluster I</i>	35 \pm 23	60 \pm 26	0,012
<i>Actinomyces sp. EO011</i>	31 \pm 21	7 \pm 11	0,001
<i>C. rectus / consisus</i>	27 \pm 19	39 \pm 25	NS
<i>S. sanguinis</i>	26 \pm 20	16 \pm 20	NS
<i>D. pneumonsites</i>	22 \pm 23	27 \pm 33	NS
<i>P. endodontalis</i>	22 \pm 17	48 \pm 26	0,005
<i>Deferribacteres sp. W090</i>	22 \pm 16	22 \pm 20	NS
<i>A. rimae</i>	21 \pm 22	13 \pm 12	NS
<i>T. forsythia</i>	20 \pm 15	60 \pm 21	0,001
<i>Desulfobulbus sp. R004</i>	20 \pm 19	23 \pm 21	NS
<i>Campylobacter sp cluster I</i>	20 \pm 21	33 \pm 25	NS
<i>Prevotella sp. AH125</i>	19 \pm 26	49 \pm 23	0,001
<i>Selenomonas sp. CS002</i>	19 \pm 18	49 \pm 30	0,025
<i>Tannerella sp BU063</i>	18 \pm 13	35 \pm 26	NS
<i>Prevotella sp. DO027</i>	16 \pm 16	31 \pm 20	0,027
<i>TM7 sp. AH040 / BS002</i>	16 \pm 17	29 \pm 22	NS
<i>Porphyromonas sp. Cluster I</i>	14 \pm 23	29 \pm 14	NS
<i>Capnocytophaga sp BB167</i>	15 \pm 14	19 \pm 17	NS
<i>Megasphaera sp. CS025</i>	15 \pm 16	21 \pm 19	NS
<i>P. gingivalis</i>	13 \pm 15	62 \pm 38	0,002
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	13 \pm 28	28 \pm 22	NS
<i>Bacteroidetes sp. AU126</i>	13 \pm 13	34 \pm 26	0,014
<i>E. infirmum</i>	12 \pm 13	32 \pm 31	NS
<i>S. moorei</i>	11 \pm 12	15 \pm 16	NS
<i>T. denticola</i>	10 \pm 10	35 \pm 18	0,011
<i>E. nodatum</i>	10 \pm 12	27 \pm 13	NS
<i>Eubacterium sp. BB142</i>	10 \pm 13	18 \pm 18	NS
<i>P. alactolyticus</i>	9 \pm 12	26 \pm 31	NS
<i>Peptostreptococcus sp. DA014</i>	9 \pm 9	26 \pm 19	0,007
<i>F. alocis</i>	7 \pm 10	42 \pm 37	0,001
<i>Selenomonas sp. EW084</i>	2 \pm 5	11 \pm 17	NS

*Teste Mann-Whitney; NS=não significante. Nome das espécies bacterianas em vermelho representam espécies/filotipos ainda não cultivadas.

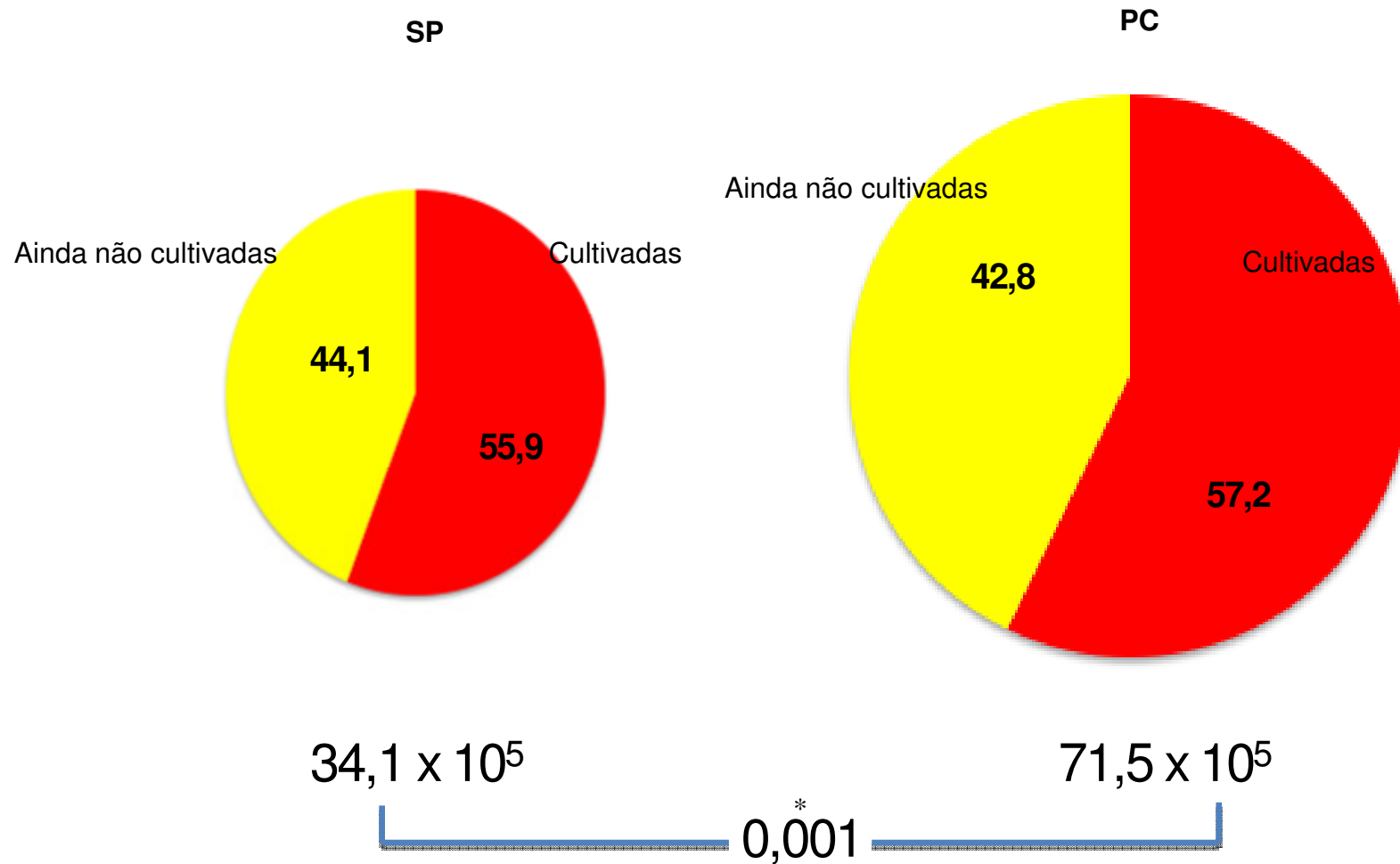


Figura 6. Média das proporções de espécies ainda não cultivadas e espécies cultivadas presentes nas amostras de biofilme subgingival em 15 indivíduos com saúde periodontal e 19 indivíduos com periodontite crônica. As áreas dos gráficos foram ajustadas para refletir a contagem total das espécies bacterianas em cada grupo.

**Teste Mann-Whitney; SP=saúde periodontal, PC= periodontite crônica*

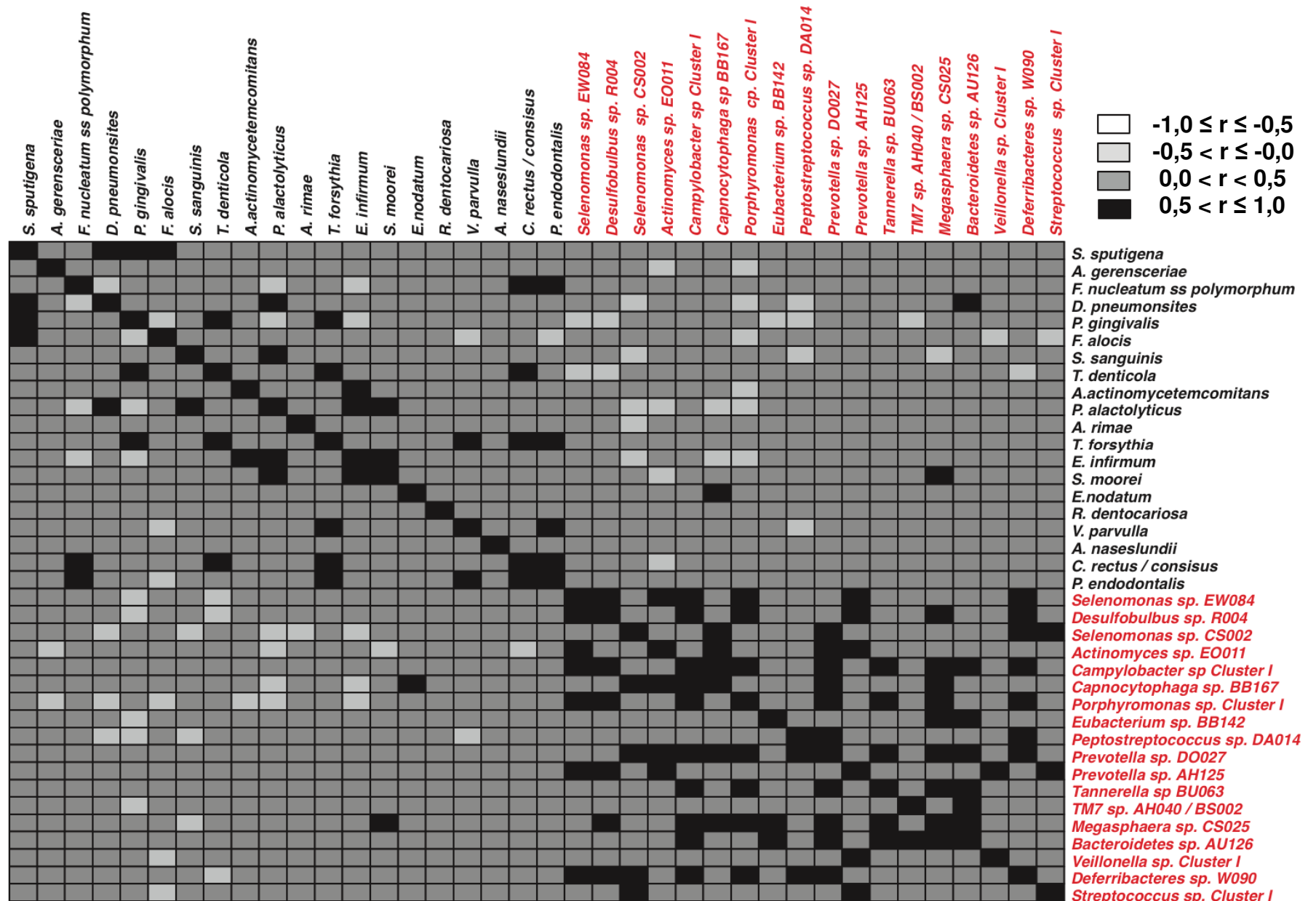


Figura 7. Matriz de correlação de Pearson entre as espécies/filotipos avaliados no presente estudo nos indivíduos com doença periodontal crônica. As espécies/filotipos ainda não cultivadas estão destacadas em vermelho.

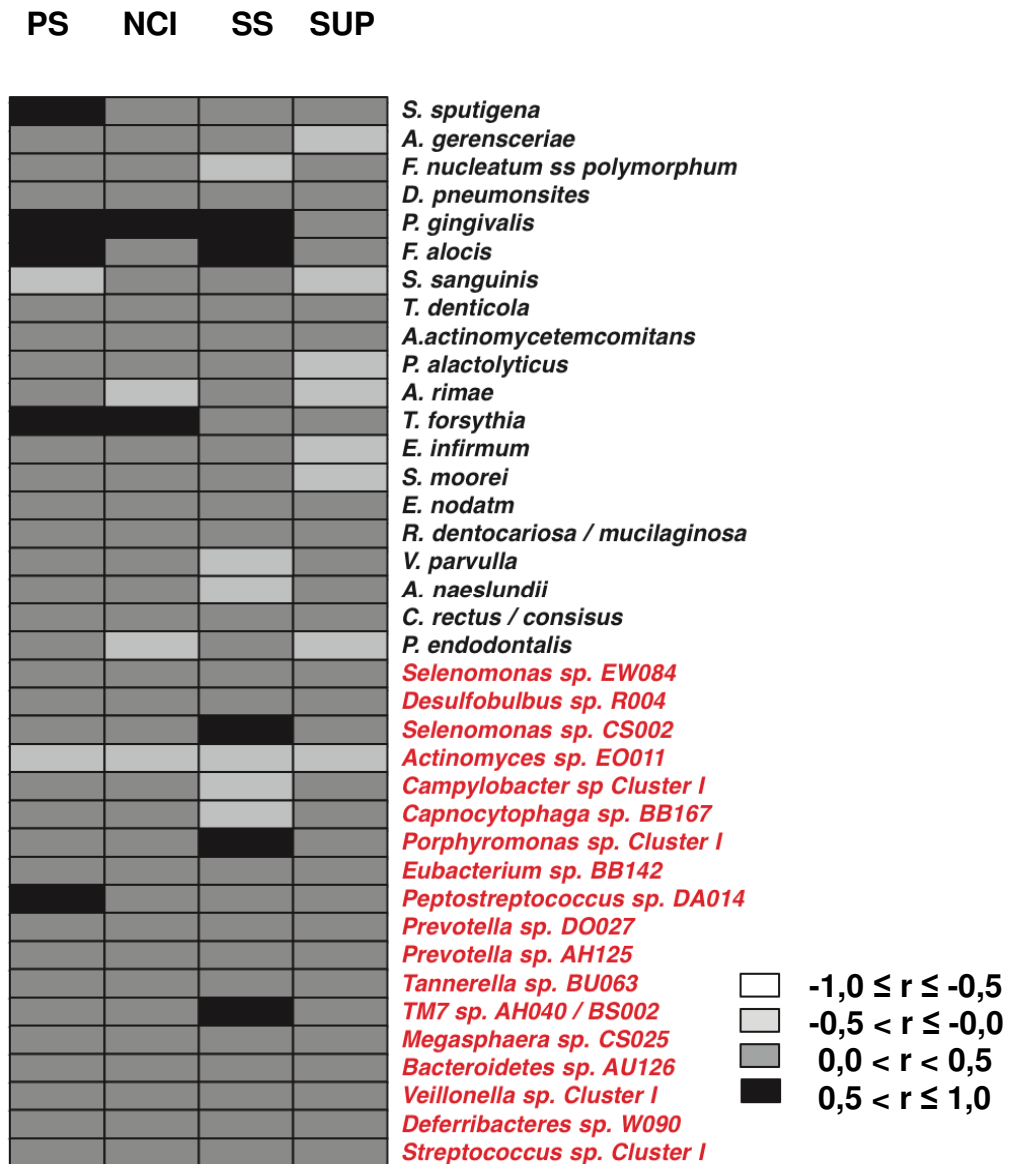


Figura 8. Matriz de correlação de Pearson entre as espécies/filotipos avaliadas no presente estudo com parâmetros clínicos periodontais mensurados nos indivíduos com doença periodontal crônica. As espécies/filotipos ainda não cultivadas estão destacadas em vermelho.

PS= profundidade de sondagem, NCI= nível clínico de inserção, SS= sangramento à sondagem, SUP= supuração

do que para espécies cultivadas. Por outro lado, as correlações existentes entre as espécies bacterianas avaliadas e os parâmetros clínicos periodontais para o grupo PC estão apresentados na Figura 8. A profundidade de sondagem apresentou correlações positivas acima de 0,5 com as espécies *S. sputigena* ($p < 0,001$), *P. gingivalis* ($p < 0,001$), *F. alocis* ($p < 0,05$), *T. forsythia* ($p < 0,05$) e *Peptostreptococcus* sp. DA014. *Selenomonas* sp. CS002, *Porphyromonas* sp. Cluster I e *TM7* sp. AH040/BS002 apresentaram correlações positivas acima de 0,5 com a presença de sangramento a sondagem ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a composição microbiana de espécies cultivadas e ainda não cultivadas em indivíduos com periodontite crônica comparando-os com indivíduos periodontalmente saudáveis. Nossos resultados indicam que há diferenças quantitativas e qualitativas nos padrões de colonização das espécies/filotipos estudados entre os dois grupos clínicos. Todas as espécies analisadas pelo presente estudo, incluindo espécies incomuns e/ou espécies ainda não cultivadas, foram detectadas em amostras de indivíduos saudáveis e de indivíduos com doença periodontal crônica (Figura 1, Tabela 5), porém em prevalências, níveis e proporções mais elevadas na periodontite crônica do que nos indivíduos saudáveis.

No grupo SP, dentre as espécies cultivadas, foram observadas médias aumentadas de contagem e proporções de *R. dentocariosa/mucilaginoso*, *S. sanguinis* e *A. rimae* nos indivíduos com saúde periodontal comparados ao grupo PC. Em adição, proporções mais elevadas de *V. parvulla*, *A. gerencseriae* e *A. naeslundii* também foram encontradas nos indivíduos periodontalmente saudáveis (Figuras 2 e 3). Esses achados corroboram com estudos anteriores em que essas espécies estavam associadas à saúde periodontal. (COLOMBO et al., 2002; HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2005; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006; FAVERI et al., 2009). *A. rimae* é uma espécie cultivada pouco estudada dentro da literatura científica relacionada às doenças periodontais. KUMAR et al. (2005) avaliaram 66 indivíduos com PC e 66 indivíduos com SP por meio da técnica do PCR e observaram que 79% e 33 % dos indivíduos do grupo SP e PC, respectivamente, eram colonizados por *A. rimae* ($p < 0,0001$). Estes dados corroboram com o presente estudo, onde dos 15 indivíduos com SP analisados 12 (80%) eram colonizados por esta espécie e dos 19 indivíduos do grupo PC apenas 6 (31,5%) eram colonizados ($p < 0,05$, dados não apresentados). *R. dentocariosa/mucilaginoso* são espécies de cocos anaeróbios facultativos Gram-positivos que habitam a cavidade bucal e raramente estão relacionados com alguma patologia bucal (RICAURTE et al. 2001). Normalmente são espécies isoladas de lesões de cárie (GEORG & BROWN, 1967), bem como de lesões de endocardite (SALAMON & PRAG, 2002). Recentemente, COLOMBO et al. (2009) por meio da técnica do

microarray observaram um perfil de colonização aumentado para esta espécie em indivíduos com SP quando comparados a indivíduos com periodontite refratária ou periodontite crônica severa. É importante destacar que esta espécie também apresentou-se em níveis e proporções significativamente superiores nos indivíduos com SP quando comparados com bolsas rasas dos indivíduos com PC (Figuras 3 e 4), desta forma reforçando ainda mais as evidências que a relacionam com a saúde periodontal. Dentre as espécies ainda não cultivadas, *Actinomyces* sp. EO011, apresentou-se em níveis e proporções superiores no grupo SP em comparação ao grupo PC, incluindo bolsas com profundidade de sondagem ≤ 3 mm (Figuras 3 e 4). Vale ainda destacar que outra espécie ainda não cultivada, *Deferribacteres* sp. W90 apresentou-se em níveis e proporções superiores nos indivíduos com SP em comparação as bolsas rasas do grupo PC. O presente estudo corrobora com os achados prévios que relacionavam estes dois filotipos com a SP (KUMAR et al., 2003; KUMAR et al., 2005; COLOMBO et al., 2009).

T. forsythia, *P. gingivalis* e *T. denticola*, espécies pertencentes ao complexo vermelho descrito por SOCRANSKY et al. (1998) apresentaram-se em níveis, proporções e prevalência mais elevados em indivíduos do grupo PC do que nos do grupo SP, mesmo em sítios com profundidade de sondagem ≤ 3 mm. Além disso, estas espécies apresentaram um aumento significativo em seus níveis conforme aumentava a profundidade de sondagem (Figuras 5 e 8). Dados similares foram reportados por (COLOMBO et al., 2002; LOPEZ et al., 2004; FAVERI et al., 2009) que analisaram a microbiota subgingival de indivíduos com periodontite crônica por meio do uso da técnicas do “Checkerboard DNA-DNA hybridization” que utilizaram sondas de DNA genômica. É importante salientar que este perfil de resultado já foi observado pela maioria das metodologias microbiológicas, sendo assim mais um ponto de controle positivo para a metodologia empregada no presente estudo.

Além das espécies do complexo vermelho, espécies cultivadas, tais como *S. sputigena* e *F. alocis* também foram encontradas em níveis, proporção e prevalência superiores em todas as análises realizadas (Figuras 1 a 5). *S. sputigena* é um bacilo, multiflagelado, dotado de motilidade, anaeróbio estrito e Gram-negativo, tem sido associado com casos de periodontite ulcerativa necrosante (GMUAR et al. 2004), periodontite de progressão rápida (KAMMA

et al. 1994), lesões periodontais ativas (HAFFAJEE et al., 1984; TANNER et al., 1998) e com a doença periodontal agressiva generalizada (FAVERI et al. 2008). Outra informação interessante foi que esta espécie foi a segunda bactéria cultivada em maior número nos indivíduos com PC. *F. alocis* foi primeiramente isolado em 1985 em amostras de fluido gengival como *Fusobacterium alocis* (CATO et al. 1985) e posteriormente reclassificado como *Filifactor alocis* (JALAVA et al. 1999). Trata-se de uma espécie Gram-positiva, anaeróbia estrita que tem a capacidade de processar N-benzoyl-DL- arginine-2-naphthylamide, assim como *P. gingivalis* e *T. denticola*. Os dados do presente estudo corroboram com estudos prévios que vinculam esta espécie a etiologia das periodontites (DAHLÉN & LEONHARDT, 2006; KUMAR et al., 2006; COLOMBO et al., 2009; SCHLAFER et al., 2010). SCHLAFER et al. (2010) estudaram em detalhes a relação desta espécies no biofilme subgengival de indivíduos com várias condições periodontais. Por meio da técnica do “*Dot blot hybridization*” os autores analisaram a presença desta espécie em 78 amostras de biofilme subgengival de bolsas profundas (média de PS $7,1 \pm 1,4$) de 30 indivíduos com PC e 82 amostras de biofilme subgengival de 19 pacientes com SP (média de PS $3,6 \pm 0,8$). Apenas 15, 8% das amostras do grupo SP apresentavam-se colonizados por esta espécie, enquanto que 76,7% das amostras do grupo CP eram positivos para *F. alocis*. Por meio da técnica “*Fluorescent in situ hybridization*” (FISH) os mesmos autores observaram que *F. alocis* concentra-se próximo a parede da bolsa periodontal e em maiores concentrações no fundo da bolsa. Um fato interessante que foi observado em nosso estudo é que ambas as espécies *S. sputigena* e *F. alocis*, apresentaram uma correlação positiva entre elas, e ambas se correlacionam com o periodontopatógeno clássico *P. gingivalis* (Figura 7). Além disso, ambos apresentam correlações positivas com o aumento da profundidade de sondagem (Figura 8). Desta forma, visto os resultados do presente estudo e os dados disponíveis na literatura, sugere-se que o *F. alocis* e *S. sputigena* podem apresentar um papel importante na etiologia das doenças periodontais e deveriam ser melhor investigadas.

Várias espécies bacterianas ainda não cultivadas também foram encontradas em grandes quantidades, proporções e prevalências na PC em comparação aos indivíduos saudáveis. Entre elas, encontram-se *Selenomonas*

sp. EW084, *Prevotella* sp. AH125, *TM7* sp. AH040/BS002, *Tannerella* sp. BU063 e *Peptostreptococcus* sp. DA014. Além disso, *Peptostreptococcus* sp. DA014 apresentou uma correlação positiva com o aumento da profundidade de sondagem, além das espécies *Selenomonas* sp. CS002 e *TM7* sp. AH040/BS002 com a presença de sangramento a sondagem (Figura 8). Os dados do presente estudo corroboram com os estudos que tem vinculado a possibilidade destas espécies ainda não cultivadas serem possíveis periodontopatógenos (PASTER et al., 2002; KUMAR et al., 2003; FAVERI et al., 2008; COLOMBO et al., 2009; TELES et al., 2011). É interessante observar que com exceção as sondas *Streptococcus* sp. Cluster I e *Veillonella* sp. Cluster I que abrangem uma série de espécies ao mesmo tempo, o filotipo *Peptostreptococcus* sp. DA014, *Prevotella* sp. AH125 e *TM7* sp. AH040/BS002 foram as 3 espécies ainda não cultivadas que apresentaram-se em maiores níveis nos indivíduos com PC. Estes dados corroboram com os achados de Teles et al. (2011), onde os autores observaram grande quantidade do filotipo *Prevotella* sp. AH125 em indivíduos com PC. Entretanto, a discussão dos achados do presente estudo em relação os níveis e proporções destes filotipos é limitada. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo em que os níveis e proporções de uma série de espécies ainda não cultivadas são mensurados, uma vez que apenas estudos que utilizaram metodologias qualitativas foram empregadas na análise destes filotipos presentes no biofilme subgengival.

De forma geral, o presente estudo avaliou a prevalência, níveis e proporções de 18 espécies ainda não cultivadas no ambiente subgengival de indivíduos com saúde periodontal ou com periodontite crônica por meio da técnica do “*RNA-oligonucleotide quantification*” (ROQT) (TELES et al. 2011). A seleção das sondas utilizadas no presente estudo baseou-se principalmente em estudos de metagenômica (PASTER et al., 2001; KUMAR et al., 2003; KUMAR et al., 2005; KUMAR et al., 2006; PASTER et al., 2006; FAVERI et al., 2008; COLOMBO et al., 2009) que observaram relações das espécies selecionadas no presente estudo com a etiologia das periodontites. Entretanto, visto alguns vieses que a técnica de clonagem e sequenciamento do gene *16S rRNA* apresenta, outras espécies ainda não cultivadas podem ter papel importante no processo etiológico das doenças periodontais.

Existe uma grande discussão na literatura a respeito da real proporção de espécies ainda não cultivadas na cavidade bucal e especialmente no ambiente subgengival (PASTER & DEWHIRST, 2009). Os estudos iniciais reportavam que cerca de 50% da microbiota ainda não havia sido cultivada (PASTER et al. 2001). FAVERI et al. (2008) analisaram a microbiota de indivíduos com periodontite agressiva generalizada e observaram que cerca de 57% das espécies/filotipos encontrados eram de espécies ainda não cultivadas.

No presente estudo, não observamos diferenças significantes entre a proporção de espécies cultivadas e ainda não cultivadas entre os indivíduos com SP e PC (Figura 6). Aproximadamente, para ambos os grupos, cerca 40 % do total de bactérias encontradas foram de espécies ainda não cultivadas. Os dados do presente estudo corroboram com os dados atuais que reportam que a população de bactérias ainda não cultivadas é de aproximadamente de 35% (PASTER & DEWHIRST, 2009; DEWHIRST et al., 2010). Visto que a proporção de espécies ainda não cultivadas representa uma proporção significativa do montante de bactérias presentes no biofilme subgengival, novos estudos devem ser desenhados com o intuito de identificar as principais espécies não cultivadas da cavidade bucal, e posteriormente promover o seu cultivo, estudar seus mecanismos de virulência, para desta forma elucidar de forma mais clara o papel destas espécies/filotipos na etiologia das doenças periodontais.

7. CONCLUSÃO

Os perfis de colonização microbiana determinados por meio da técnica *RNA-oligonucleotide quantification* de indivíduos com periodontite crônica e periodontalmente saudáveis são distintos, sendo que:

- *A. rimae*, *R. dentocariosa/mucilagionsa* e o filotipo *Actinomyces* sp. EO011 são espécies de bactérias incomuns e ainda não cultivadas encontradas em níveis e proporções mais elevadas nos indivíduos com saúde periodontal;

- Além das espécies do complexo vermelho, *S. sputigena* e *F. alocis*, e os filotipos *Selenomonas* sp. EW084, *Prevotella* sp. AH125, *TM7* sp. AH040/BS002, *Tannerella* sp. BU063 e *Peptostreptococcus* sp. DA014 foram as espécies/filotipos encontrados em níveis e proporções mais elevadas nos indivíduos com periodontite crônica.

REFERÊNCIAS

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

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

Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1997; 68: 973-981.

Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *J Periodontol.* 1992; 63: 540-547.

American Academy of Periodontology. International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions. *Annals of Periodontol.* 1999; 4: 8-38

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: 1736-1740.

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

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

Avila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Arbitrary primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. *J Periodontol* 1999; 70: 1202-1208.

Beltrami M, Bickel M, Baehni PC. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1984 14: 161-164.

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.

Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1993; 2: 57-71.

Cato EP, Moore LVH, Moore WEC. *Fusobacterium alocis* sp. nov. and *Fusobacterium sulci* sp. nov. from the human gingival sulcus. *Int J Syst Bacteriol.* 1985; 35: 475–477.

Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 897-903.

Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst F, Paster BJ. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol.* 2009; 80: 1421-32.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318-22.

Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent Jr. RL, Socransky SS. The effect of scaling and root planning on the clinical and microbiological parameters of periodontal disease: 12-month results. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 30-6.

Dahan M, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Van Der Velden U. The effect of periodontal treatment on the salivary bacterial load and early plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 972-977.

Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 6-11.

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010; Oct, 192(19): 5002-17.

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 Microbiology Immunology* 2006; 21: 61-8.

Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Müller GA. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem.* 1993; 210: 235-44.

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

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

Forgas LB, Nilius AM. Assessing periodontal disease activity. The role of bacteriological, immunological and DNA assays. *J Dent Hyg.* 1991; 65: 188-93.

Furuichi Y, Ramberg P, Lindhe J, Nabi N, Gaffar A. Some effects of mouthrinses containing salifluor on de novo plaque formation and developing gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 795-802.

Georg LK, Brown JM. *Rothia*, Gen Noc, An Aerobic Genus of the Family *Actinomycetaceae*. *Int J Systematic Bact* 1967; 17: 79-88.

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

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

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: 324-34.

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, Japlit M, Bogren A, Kent RL Jr, Goodson JM, Socransky SS. Differences in the subgingival microbiota of Swedish and USA subjects who were periodontally healthy or exhibited minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 33-9.

Hugenholtz P, Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotechnology* 1996; 14: 190-197.

Jalava J, Eerola E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49: 1375-1379

Kamma JJ, Nakou M, Persson RG. Association of early onset periodontitis microbiota with aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 2001; 28: 1096-1105.

Kazor CE, Mitchell AM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiology* 2003; 41: 558-563.

Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, ten Cate JM, Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res.* 2008; 87: 1016-20.

Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Iida T, Shizukuishi S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 168-76.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Research* 2003; 82: 338-344.

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of Candidate Periodontal Pathogens and Beneficial Species by Quantitative 16S Clonal Analysis. *J Clin Microbiology* 2005; 43: 3944-3955.

Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 3665-73.

Lang NK. Consensus reports: aggressive periodontitis. *Anns Periodontology* 1999; 4: 53

Lie MA, Danser MM, Van Der Weijden GA, Timmerman MF, De Graaf J, Van Der Velden U. Oral microbiota in subjects with a weak or strong response in experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 642-647.

Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung CP, Flemmig T et al. Consensus report: chronic periodontitis. *Ann Periodontol* 1999; 4: 38.

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.

Listgarten MA. Comparative differential dark field microscopy of subgingival bacteria. *J Periodontol.* 1983; 54: 92-107.

Listgarten MA. Rationale for using microbiological diagnosis as an adjunct to periodontal treatment. *Penn Dent J* 1993; 92: 5-6.

Liu L, Wen X, He H, Shi J, Ji C. Species-specific DNA probe for the detection of *Porphyromonas gingivalis* from adult chinese periodontal patients and healthy subjects. J Periodontol. 2003; 74: 1000-6.

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

Loesche WJ. The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. Oral Microbial Immunol. 1986; 14: 65-72

Masunaga H, Tsutae W, Oh H, Shinozuka N, Kishimoto N, Ogata Y. Use of quantitative PCR to evaluate methods of bacteria sampling in periodontal patients. J Oral Sci. 2010; 52: 615-21.

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

Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. J Clin Periodontol. 1991; 18: 729-739.

Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolf LF, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early onset periodontitis. J Periodontol Research 2000; 35: 232-241.

Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. J Periodontal Research 1977; 2: 120-128.

Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annual Review Microbiology 1986; 40: 337-365.

Omar AA, Newman HN, Bulman J, Osborn J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. J Clin Periodontol. 1990; 17: 364-370.

Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Yam WC, Jin LJ, Samaranayake LP. Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. Oral Disease 2010; 16: 136-45.

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: 3770-3783.

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

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

Paster BJ & Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontology* 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.

Ricaurte JC, Klein O, Labombardi V, Martinez V, Serpe A, Joy M. *Rothia dentocariosa* endocarditis complicated by multiple intracranial hemorrhages. *Southern Medical Journal* 2001; 94: 438–40.

Salamon SA, Prag J. Three cases of *Rothia dentocariosa* bacteraemia: frequency in Denmark and a review. *Scand. J. Infect. Dis*. 2002; 34: 153-157.

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. *Microbiology Immunology* 2000; 44: 643-652.

Schlafer D, Riep B, Griffen AL, Petrich A, Hübner J, Berning M, Friedman A, Göbel UB, Moter A. Filifactor alocis - involvement in periodontal biofilms. *BMC Microbiology* 2010; 10: 66.

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: 788-792.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini Ma, Smith C, Kent RI Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 134-144.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38: 135-187.

Tsai CY, Wolff LF, Germaine G, Hodges J. A rapid DNA probe test compared to culture methods for identification of subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 57-62.

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. *Molecular Oral Microbiology* 2011; 26: 127-39.

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

Tonetti MS, Mobelli A. Early-onset periodontitis. *Anns Periodontology* 1999; 4: 39-53.

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.

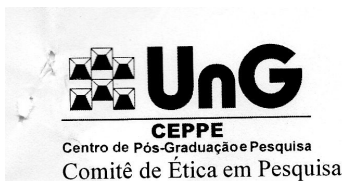
Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *European Journal of Oral Sciences* 2005; 11: 28-33.

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1985; 12: 1-20

Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology 2000*. 1995; 7: 69-82

Zoetendal EG, Ben-Amo 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