

**MARCELO DE FAVERI**

**DIVERSIDADE BACTERIANA POR ANÁLISE  
CLONAL DE *16S rRNA* E PELA HIBRIDAÇÃO  
DNA-DNA EM AMOSTRAS DE BIOFILME  
SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS  
PORTADORES DE PERIODONTITE  
AGRESSIVA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências (Microbiologia).

São Paulo  
2007

**MARCELO DE FAVERI**

**DIVERSIDADE BACTERIANA POR ANÁLISE  
CLONAL DE *16S rRNA* E PELA HIBRIDAÇÃO  
DNA-DNA EM AMOSTRAS DE BIOFILME  
SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS  
PORTADORES DE PERIODONTITE  
AGRESSIVA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

São Paulo  
2007

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

**Candidato:** Marcelo de Faveri

**Tese:** Análise da diversidade bacteriana por análise clonal de 16S *rRNA* e pela hibridação DNA-DNA em amostras de biofilme subgingival de indivíduos portadores de periodontite agressiva.

**Orientador:** Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

**A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa de Doutorado, em sessão pública realizada a \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, considerou o**

( ) **Aprovado**      ( ) **Reprovado**

**Examinador (a) Assinatura:**.....  
**Nome:** .....  
**Instituição:** .....

**Examinador (a) Assinatura:**.....  
**Nome:** .....  
**Instituição:** .....

**Examinador (a) Assinatura:**.....  
**Nome:** .....  
**Instituição:** .....

**Examinador (a) Assinatura:**.....  
**Nome:** .....  
**Instituição:** .....

**Presidente (a) Assinatura:**.....  
**Nome:** .....  
**Instituição:** .....

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jair e Neide,

Que com coragem, perseverança e integridade enfrentaram as adversidades da vida, auxiliando-me a desenvolver virtudes nos campos intelectuais e morais. Meu mais sincero agradecimento pela bênção de seu amor incondicional e fé em minha capacidade.

## **AGRADESCIMENTO ESPECIAIS**

### **À DEUS**

.....pela vida e pelas oportunidades. Que com incomparável e inconfundível bondade compreende os nossos anseios e nos dá a necessária coragem para atingirmos o nosso objetivo.

### **À Profa. Dra. Marcia Mayer**

Orientadora incansável, persistente, que sempre esteve presente para tudo e em todos os momentos necessários para meu crescimento intelectual. Sua determinação, coragem e princípios irão me influenciar sempre. O meu muito obrigado!

### **À Profa Dra. Magda Feres e Profa. Dra. Luciene Figueiredo**

Dedicação, orientação do caminho a ser tomado, onde muito mais que orientadoras, tornaram-se um exemplo a ser seguido. Minha profunda admiração e respeito pelo exemplo de competência profissional e humana.

# Agradecimentos

A meu irmão Junior, a Anna Paula e Natália, obrigado por vocês estarem sempre presente na minha vida dividindo os momentos felizes.

A Camila Esteves, que sempre esteve presente quando eu mais precisei. O meu muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Bruce Paster, pela ajuda e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Dr. José Augusto, Cristiane, André, Poliana, Jamil e Claudia. Obrigado pela paciência e pela ajuda nos momentos de dificuldade.

A minha amiga Ellen, que sempre me ajudou quando precisei. Muito obrigado por toda a paciência e por sempre me ensinar os caminhos no laboratório.

Aos meus colegas e amigos de laboratório; Amanda, Silvia, Adriana, Priscila, Ana, Flávia, Irineu, César e Fábio.

A Izilvania por toda a ajuda no desenvolvimento da parte laboratorial deste estudo.

A todos os indivíduos que aceitaram participar deste estudo que acabaram dividindo um pouco de suas vidas comigo.

*A FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO pela ajuda financeira por meio do processo de auxílio pesquisa nº 2006/52890-6 e pelo auxílio bolsa nº 05/59443-2*

## Resumo

FAVERI, M. **Diversidade bacteriana por análise clonal de 16S rRNA e pela Hibridação DNA-DNA em amostras de biofilme subgengival de indivíduos portadores de periodontite agressiva.** 2007. 77 f. Tese (Doutorado em microbiologia) – Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade bacteriana no biofilme subgengival de indivíduos portadores de doença periodontal agressiva (PA) usando métodos moleculares independentes de cultura baseados na clonagem do gene *16S rRNA* e pela técnica da Hibridação DNA-DNA. Doze indivíduos com PA e 30 indivíduos com saúde periodontal (S) foram selecionados. Medidas de profundidade de sondagem, (PS), nível clínico de inserção, sangramento à sondagem, sangramento gengival, acúmulo de placa supragengival e supuração foram mensurados em 6 sítios por dente. Amostras de placa subgengival foram coletadas de 9 sítios por indivíduo para análise na técnica da Hibridação DNA-DNA. Para a análise clonal do gene *16S*, uma amostra por indivíduo com  $PS \geq 7$ mm de 10 indivíduos com PA foram selecionados. O DNA foi extraído e o gene *16S rRNA* foi amplificado usando o par de iniciadores universais 9F e 1525R. Os genes amplificados foram clonados, seqüenciados e identificados comparando com o banco de dados de seqüências *16S rRNA*. Os níveis médios, proporção e % de sítios colonizados por 38 espécies subgengivais foram determinados utilizando a Hibridação DNA-DNA e a diversidade da microbiota subgengival foi determinada utilizando a análise clonal *16S*. Patógenos periodontais, tais com *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* foram encontrados em alta proporção no grupo PA ( $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo S, mesmo

em bolsas rasas ( $PS \leq 3\text{mm}$ ). Espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro, tais como *Actinomyces* e *Streptococcus* ssp estavam em níveis elevados na saúde periodontal. *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado em níveis elevados, proporções e prevalência no grupo PA em comparação ao grupo S utilizando sondas genômicas. Em relação à análise clonal do gene 16S, 120 diferentes espécies foram identificadas em 10 indivíduos e 1094 clones foram seqüenciados. Destes, 70 espécies foram as mais prevalentes. 57% destas espécies não foram cultivadas. Várias espécies de *Selenomonas* e *Streptococcus* foram encontradas em alta prevalência e proporção em todos os indivíduos. De uma maneira geral, 50% da biblioteca genômica foi formada por espécies destes dois gêneros. *Selenomonas sputigena*, foi a espécie mais comumente detectada, sendo encontrada em 9 dos 10 indivíduos. Outras espécies de *Selenomonas* frequentemente presentes em altos níveis, foram *Selenomonas noxia*, *Selenomonas* sp. EW084, *Selenomonas* sp. EW076, *Selenomonas* FT050, *Selenomonas* sp. P2PA\_80 e *Selenomonas* sp. strain GAA14. A microbiota subgengival do grupo PA difere marcadamente dos indivíduos do grupo S e outras espécies, provavelmente espécies de *Selenomonas* podem estar associadas à doença periodontal agressiva.

**Palavras-chaves:** Doença periodontal agressiva, microbiota subgengival, bactérias não-cultiváveis, gene 16S rRNA, sondas genômicas.



## Abstract

FAVERI, M. **Microbiological diversity by 16S rRNA clonal analysis and by Checkerboard DNA-DNA Hybridization in subgingival biofilm samples of subjects with aggressive periodontitis.** 2007. 77 f. thesis (Doctorate in Microbiology) – Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The purpose of this study was to determine the bacterial diversity in the subgingival plaque of subjects with aggressive periodontitis (AgP) by using culture-independent molecular methods based on ribosomal 16S rRNA gene cloning and by using the Checkerboard DNA-DNA hybridization technique. Twelve subject with AgP and 30 periodontally healthy (PH) subjects were selected. Measurement of pocket depth (PD), clinical attachment level, bleeding on probing, gingival bleeding, supragingival plaque accumulation and suppuration were recorded at 6 sites per tooth. Subgingival plaque samples were collected from 9 sites per subject for using in the Checkerboard DNA-DNA technique. For the 16S cloning analysis one sample per subject with  $PD \geq 7$ mm of 10 subjects with AgP were selected. DNA was extracted and 16S rRNA gene amplified with universal primer pairs 9F and 1525R. Amplified genes were cloned, sequenced and identified by comparison with 16S rRNA database. The mean counts, proportions and % of sites colonized by 38 subgingival bacterial species were determined by checkerboard DNA-DNA hybridization and the diversity of the subgingival microbiota was determined by 16S cloning analysis. Periodontal pathogens, such as *T. forsythia*, *P. gingivalis* and *T. denticola* were found in higher proportions AgP groups ( $p < 0.001$ ) than in PH subjects, even in shallow pockets ( $PD \leq 3$ mm). Species considered being host compatible, such as

*Actinomyces* and *Streptococcus* ssp. were elevated in periodontal health. *A. actinomycetemcomitans* was found in higher levels, proportions and prevalence in AgP than in PH subjects using genomic probes. As regard the 16S gene cloning analysis, 120 species were identified from 10 subjects and 1094 clones sequenced. Of these, 70 species was most prevalent. 57% of the species were not cultivable. Several species of *Selenomonas* and *Streptococcus* were found in high prevalence and proportion in all subjects. Overall, 50% of the clone libraries were formed by these two genera. *Selenomonas sputigena*, the specie most commonly detected, was found in 9 of 10 subjects. Other species of *Selenomonas* were often present in high levels, including *Selenomonas noxia*, *Selenomonas* sp. EW084, *Selenomonas* sp. EW076, *Selenomonas* FT050, *Selenomonas* sp. P2PA\_80 and *Selenomonas* sp. strain GAA14. The subgingival microbiota of AgP markedly differed from PH subjects using genomic probes and other species, notably species of *Selenomonas*, may be associated with disease in aggressive periodontitis subjects.

**Key-words:** aggressive periodontitis; subgingival microbiota, uncultivable bacteria, 16S rRNA gene, genomic probe.

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies foram ordenadas de acordo com os complexos descritos por SOCRANSKY et al. 1998.
- Tabela 2.** Códigos utilizados para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de placa subgengival, após exame visual dos sinais observados para cada amostra e comparação com controles em filmes radiográficos obtidos após a hibridação DNA-DNA.
- Tabela 3.** Média ( $\pm$ DP) dos parâmetros demográficos e clínicos para os indivíduos periodontalmente saudáveis e portadores de doença periodontal agressiva.
- Tabela 4.** Frequências médias de sítios de acordo com diferentes categorias de Profundidade à Sondagem e Nível Clínico de Inserção no grupo Periodontite Agressiva (PA).
- Tabela 5.** Frequência e proporção das espécies encontradas pela clonagem e sequenciamento de uma amostra individual realizada em duplicata.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Perfil microbiano das médias de contagem ( $\times 10^6$  células), da proporção das sondas de DNA e do percentual de sítios colonizados das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Análise de covariância ajustada para idade: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas segundo SOCRANSKY et al. (1991).
- Figura 2.** Média da contagem total ( $\times 10^6$ ) e média das proporções dos complexos microbianos descritos por SOCRANSKY et al. (1998), presentes nas amostras de placa subgengival dos indivíduos nos dois grupos experimentais. O grupo azul é constituído por 3 espécies de Actinomyces. A área dos gráficos foi ajustada para refletir a diferença da contagem total de bactérias entre os dois grupos experimentais. Análise de covariância ajustada para idade (\* $p < 0,01$ ).
- Figura 3.** Perfil microbiano das médias da proporção das sondas de DNA das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis (sítios com profundidade de sondagem  $PS \leq 3\text{mm}$ ) e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada (sítios separados por categoria de profundidade de sondagem – PS, sendo rasos:  $\leq 3\text{mm}$ , intermediários: 4-6mm e profundos:  $\geq 7\text{mm}$ ). Análise de covariância ajustada para idade: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas segundo SOCRANSKY et al. (1991).
- Figura 4.** Gráfico de dispersão da proporção de *A. actinomycetemcomitans* distribuídos nos diferentes sítios analisados nos indivíduos periodontalmente saudáveis e com doença periodontal agressiva e a correlação de Pearson entre a proporção de *A. actinomycetemcomitans* nos indivíduos com doença periodontal agressiva e a profundidade de sondagem.
- Figura 5.** Gráfico de dispersão da proporção do complexo vermelho distribuído nos diferentes sítios analisados nos indivíduos com saúde periodontal e com doença periodontal agressiva e a correlação de Pearson entre a proporção deste complexo e a profundidade de sondagem nos indivíduos com doença periodontal agressiva. As proporções das espécies pertencentes a este complexo, *P.gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, em cada sítio foram

somadas individualmente, depois entre cada indivíduo e posteriormente dentro de cada grupo.

- Figura 6.** Gráfico de área das médias das proporções e dos níveis de contagem das 38 espécies bacterianas avaliadas nas amostras de biofilme subgingival nos indivíduos portadores de periodontite agressiva em bolsas rasas ( $PS \leq 3\text{mm}$ ), bolsas intermediárias ( $PS = 4-6\text{mm}$ ) e bolsas profundas ( $PS \geq 7\text{mm}$ ). Teste Friedman ( $*p < 0,05$ ). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas segundo SOCRANSKY et al. (1991).
- Figura 7.** Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação de diferentes amostras clínicas (canaletas de 1-12) utilizando os iniciadores relacionados no item 2.5.9 foram submetidos a eletroforese e apresentam tamanho aproximado de 1.500pb. Em (+) Controle positivo - *E.coli* ATCC 33270; (-) Controle negativo; 1kb plus: Peso Molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).
- Figura 8.** Árvore filogenética construída a partir da sequência de 1.500 pb do gene *16S rRNA* das espécies mais prevalentes observadas na biblioteca genômica obtida por meio da clonagem de 10 amostras de biofilme subgingival de 10 indivíduos portadores de doença periodontal agressiva. Foram detectadas 70 diferentes espécies de bactérias. A barra superior representa a diferença de 5% na sequência genômica entre as espécies.
- Figura 9.** Árvore filogenética construída a partir da sequência de 1.500 pb do gene *16S rRNA* das espécies observadas na biblioteca genômica obtida por meio da clonagem de 2 amostras de biofilme subgingival de sítios profundos ( $PS > 7\text{mm}$ ; P-1 e P-2) e de uma amostra de sítio raso ( $PS < 3\text{mm}$ ; S) de um mesmo indivíduo. A barra superior representa a diferença de 5% na sequência genômica entre as espécies.

## SÚMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 Seleção da população.....	21
3.2 Avaliação clínica.....	21
3.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	23
3.3.1 Critérios de inclusão.....	23
3.3.2 Critérios de exclusão.....	24
3.4 Seleção dos sítios testes.....	24
3.4.1 Coleta das amostras de placa subgengival.....	24
3.5 Análise microbiológica.....	25
3.5.1 Análise microbiológica por meio da técnica da Hibridação DNA-DNA.....	25
3.5.2 Análise da microbiota por sequenciamento do gene 16S <i>rRNA</i> .....	32
3.5.2.1 Seleção dos sítios testes.....	32
3.5.2.2 Extração de DNA.....	32
3.5.2.3 Amplificação da região 16S pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	33
3.5.2.4 Clonagem.....	34
3.5.2.4 Sequenciamento.....	35
3.5.2.5 Análise dos dados dos 16S <i>rRNA</i> sequenciados.....	36
3.6 Análise Estatística.....	36
3.6.1 Análise Clínica.....	36
3.6.2 Análise microbiológica (Hibridação DNA-DNA).....	37
<b>4 RESULTADOS</b> .....	38
4.1 Resultados clínicos.....	38
4.2 Análise microbiológica.....	40
4.2.1 Hibridação DNA-DNA.....	40
4.2.2 Correlações clínicas e microbiológicas.....	47
4.2.3 análise da microbiota por sequenciamento do gene 16S <i>rRNA</i> .....	53
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	89

## 1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal agressiva é uma infecção que acomete indivíduos sistemicamente saudáveis, caracterizada por uma grande perda de inserção clínica associada a uma rápida destruição óssea alveolar, atingindo normalmente indivíduos jovens (TONETTI e MOMBELI, 1999; ARMITAGE, 1999; LANG et al., 1999). Esta periodontite pode apresentar-se na forma localizada ou generalizada, dependendo da extensão da infecção (ARMITAGE, 1999; LANG et al., 1999; ARMITAGE, 2004).

A microbiota da doença periodontal agressiva é complexa consistindo geralmente de bactérias anaeróbias Gram-negativas, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*; NORSKOV-LAURITSEN e KILIAN 2006), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus* e *Fusobacterium* ssp. (LOESCHE et al., 1985; MULLALLY et al., 2000; KAMMA et al., 2001, KAMMA et al., 2004). O papel de bactérias específicas, especialmente do *A. actinomycetemcomitans* na forma localizada da doença periodontal agressiva tem sido extensivamente estudado em adolescentes e adultos jovens (ZAMBON et al., 1983; TINOCO et al., 1997; DARBY et al., 2000; CORTELLI et al., 2005; YANG et al., 2005). SLOTS et al. (1980), analisando por meio de cultura microbiana, amostras de biofilme subgingival de bolsas periodontais profundas de pacientes portadores de doença periodontal agressiva localizada, detectaram *A. actinomycetemcomitans* em 9 dos 10 indivíduos analisados. Outros estudos detectaram *A. actinomycetemcomitans* em cerca de 75 a 100% das amostras de

bolsas periodontais ativas na doença periodontal agressiva (SLOTS et al., 1980; MANDELL e SOCRANSKY, 1981; ZAMBON et al., 1983; CHRISTERSSON et al., 1985; ZAMBON, 1985; RUSSO et al., 1998; LEE et al., 2003; CORTELLI et al., 2003; YANG et al., 2005) demonstrando assim a relação existente entre este patógeno e a forma agressiva da doença periodontal. Por outro lado, a prevalência deste patógeno em indivíduos jovens sem perdas ósseas alveolares ou portadores de doença periodontal crônica é mais baixa, variando entre 19 a 28% (TINOCO et al., 1997; MOMBELI et al., 2002; CORTELLI et al., 2005).

Embora *A. actinomycetemcomitans* seja considerado como o principal patógeno na doença periodontal agressiva, existem algumas controvérsias na literatura (HAN et al., 1991; LOPEZ et al., 1996; MULLALLY et al., 2000; KAMMA et al., 2001; ISHIKAWA et al., 2002; TREVILATTO et al., 2002; TAKEUCHI et al., 2003; GAJARDO et al., 2005). MULLALLY et al. (2000), e KAMMA et al. (2001), estudando populações na Irlanda do Norte e na Grécia, respectivamente, observaram por meio da técnica do PCR (Reação em cadeia da polimerase) uma baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* (28% e 18,8%) em bolsas periodontais de indivíduos com doença periodontal agressiva localizada. Em outro estudo, HAN et al. (1991) não detectaram por cultura *A. actinomycetemcomitans* em nenhuma das 23 amostras subgingivais obtidas de indivíduos chineses portadores da forma agressiva da doença periodontal. TREVILATTO et al. (2002) estudaram uma família brasileira com doença periodontal agressiva (n=14) e relataram uma baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, questionando assim o valor do isolamento deste



microrganismo como forma de diagnóstico para a doença periodontal agressiva. Recentemente, GAJARDO et al. (2005) por meio de cultura microbiana isolaram *A. actinomycetemcomitans* em apenas 19,4% das bolsas periodontais de 30 indivíduos com doença periodontal agressiva em uma população chilena. Esta baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* na população chilena já havia sido reportada por LOPEZ et al. (1996). Complementando, MOMBELLI et al. (2002), em uma revisão sistemática da literatura, relataram que a presença ou ausência de *A. actinomycetemcomitans* não pode ser um parâmetro para diferenciar indivíduos com doença periodontal agressiva e com a forma crônica da doença. Assim, estes estudos sugerem que outros microrganismos podem estar associados à etiologia da doença periodontal agressiva.

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, forma e motilidade 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). O método de cultura, considerado o “padrão-ouro”, é capaz de identificar diversos microrganismos presentes no biofilme dental, além de ser extremamente importante para a busca de novas espécies e para a determinação da susceptibilidade microbiana a diferentes antibióticos (NEWMAN e SOCRANSKY, 1977; ALI et al., 1992; LIE et al., 1995). Entretanto estima-se atualmente que a cavidade bucal apresente aproximadamente 700 espécies de

bactérias, sendo que mais de 50% destas espécies ainda não foram cultivadas (KAZOR et al. 2003). Assim, outros microrganismos poderiam estar associados à doença periodontal, embora muitos não tenham sido ainda cultivados e caracterizados (PASTER et al., 2001; KUMAR et al., 2005). Desta maneira, vários métodos independentes de cultura surgiram nos últimos anos com o objetivo de obter maiores informações sobre a composição da microbiota bucal, entre eles, métodos baseados em sondas de DNA como o a técnica da Hibridação DNA-DNA (Checkerboard DNA-DNA Hybridization), ou na PCR qualitativa ou quantitativa usando PCR em tempo real.

O método da Hibridação DNA-DNA foi desenvolvido por SOCRANSKY et al. (1994) e utiliza sondas genômicas de DNA para a identificação de até 40 espécies bacterianas em 28 amostras de biofilme dental por teste. Esta técnica permite a elaboração de estudos de grande porte para o conhecimento da microbiota das doenças periodontais, propiciando a avaliação de um grande número de amostras e de microrganismos bucais ao mesmo tempo. As maiores vantagens deste método de diagnóstico incluem a rápida identificação e a avaliação semiquantitativa dos microrganismos presentes nas amostras, a identificação de bactérias de difícil cultivo e o baixo custo. Sendo assim, a Hibridação DNA-DNA têm sido utilizada com sucesso na avaliação da composição da microbiota subgingival e de outros nichos da cavidade oral (HAFFAJEE et al., 1997a, b; FERES et al., 1999; CUGINI et al., 2000; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000; FERES et al., 2001; FAVERI et al., 2006).

Para determinar a diversidade bacteriana, sem a necessidade do cultivo dos microrganismos, foram desenvolvidos também métodos baseados na extração do DNA da amostra, amplificação da região do gene *16S rRNA* com a utilização de iniciadores universais, clonagem do amplicom em *Escherichia coli* e sequenciamento genético (OLSEN et al., 1986; HUGENHOLTZ e PACE, 1996; HUGENHOLTZ et al., 1998; PASTER et al., 2001; KAZOR et al., 2003; KUMAR et al., 2005). Investigações utilizando esta metodologia em amostras de biofilme subgingival de indivíduos portadores de doença periodontal crônica, demonstraram a presença de novos filotipos (espécies) de bactérias que poderiam estar associados à periodontite crônica (SAKAMOTO et al., 2000; PASTER et al., 2001; KUMAR et al., 2003; KUMAR et al., 2005). PASTER et al. (2001) relataram que a comunidade bacteriana presente no ambiente subgingival consistia em aproximadamente 415 espécies baseados na análise de 2522 clones *16S rRNA* e estimaram que o total da diversidade bacteriana na cavidade bucal seria de 500 espécies.

## 2 OBJETIVOS

Baseado no exposto, os objetivos do presente estudo foram:

Avaliar a microbiota presente na doença periodontal agressiva pela:

- Determinação do perfil microbiano por Hibridação DNA-DNA e comparação com o perfil obtido de amostras de indivíduos com saúde periodontal, correlacionando os dados clínicos com os dados microbiológicos.
- Estimativa da diversidade bacteriana pela técnica da análise clonal de *16S rRNA*.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção da população**

Foram selecionados 12 indivíduos portadores de periodontite agressiva (grupo PA) e 30 indivíduos com saúde periodontal (grupo S - controle). Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo, seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas, forma de coleta de amostras e terapias que seriam realizadas. Os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 01), responderam a um questionário de saúde/anamnese (Anexo 2) e quando necessário receberam a terapia periodontal, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96). O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) obtendo o parecer favorável a sua realização (Anexo 3).

#### **3.2 Avaliação clínica**

O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador previamente treinado no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo e selecionar os sítios-teste.

Todos os dentes, exceto os terceiros molares, foram avaliados em 6 sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), para os seguintes parâmetros:

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

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

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

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

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

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

A metodologia utilizada para a calibração do examinador foi preconizada por ARAUJO et al. (2003) onde se avaliou 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 e.m.p foram de 0,14mm e 4,3% para a profundidade de sondagem e de 0,31mm e 7,86% para o nível clínico de inserção, respectivamente. Para as variáveis categóricas (índice de placa visível e índice de sangramento gengival), considerando somente a presença ou a ausência do parâmetro clínico, foi

realizada a média do nível de concordância para o examinador, sendo encontrada uma concordância superior a 92% (Teste Kappa).

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

### **3.3 Critérios de inclusão e exclusão**

#### **3.3.1 Critérios de inclusão**

##### **Doença periodontal agressiva (PA)**

Os indivíduos foram selecionados segundo alguns critérios propostos pela Academia Americana de Periodontia (AAP) (ARMITAGE 1999): possuir no mínimo 20 dentes, excluindo-se os terceiros molares; possuir mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal apresentando profundidade à sondagem e nível clínico de inserção maior do que 5 mm, não contíguos, localizados na região de incisivos e molares e outros 6 dentes com as mesmas características clínicas localizados em outros grupos de dentes, e idade  $\leq$  30 anos.

##### **Indivíduos com saúde periodontal (S)**

Ter idade superior a 20 anos de idade; possuir no mínimo 20 dentes excluindo-se os terceiros molares; não apresentar sítios com PS e/ou NCI maior do que 4 mm; não apresentar sinais clínicos de gengivite generalizada e não apresentar mais de 30% dos sítios com sangramento à sondagem.

### **3.3.2 Critérios de exclusão**

Ser fumante; estar grávida ou amamentando; ter realizado tratamento periodontal previamente; uso de antibióticos sistêmicos nos últimos 12 meses; ter utilizado antissépticos bucais nos últimos seis meses; ter história de doença sistêmica que comprometa a resposta do hospedeiro ou exija medicação profilática ao tratamento.

### **3.4 Seleção dos sítios testes**

Foram selecionados aleatoriamente 3 sítios com  $PS \leq 3$  mm, 3 sítios com PS entre 4 e 6 mm e 3 sítios com  $PS \geq 7$  mm nos indivíduos com doença periodontal agressiva. Quando o indivíduo não possuía 3 sítios  $\geq 7$  mm, foram coletados sítios intermediários (entre 4 e 6 mm) para completar os 9 sítios. Nos indivíduos com saúde periodontal foram coletados 9 sítios com  $PS \leq 3$ mm que não apresentavam sangramento à sondagem.

#### **3.4.1 Coleta das amostras de placa subgengival**

Após a remoção da placa supragengival a coleta de amostras de biofilme subgengival foi feita com curetas Gracey 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 (tubo 1) contendo 200  $\mu$ l de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). Imediatamente após a coleta da amostra, esta foi homogeneizada por 1 minuto em agitador de tubos e alíquotas de 50  $\mu$ l foram transferidas para um segundo tubo (tubo 2). Foram



acrescidos 100 µl de solução de NaOH a 0,5 M ao tubo 1 contendo 150 µl de suspensão bacteriana em tampão TE, para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo para análise por meio da técnica da Hibridação DNA-DNA (Checkerboard DNA-DNA Hybridization). A amostra contida no tubo 2 foi utilizada para a extração do DNA, e posterior amplificação do gene *16S rRNA*. Estes tubos foram identificados e armazenados à -70°C por um período máximo de 3 meses até serem analisados.

### **3.5 Análise microbiológica**

#### **3.5.1 Análise microbiológica por meio da técnica da Hibridação DNA-DNA.**

##### **Amostras**

As amostras para a análise por meio da técnica da Hibridação DNA-DNA foram selecionadas conforme o item 3.4 Seleção dos sítios testes. Assim, foram avaliadas 108 amostras de indivíduos portadores de doença periodontal agressiva e 270 amostras de indivíduos com saúde periodontal.

##### **Preparo das sondas**

##### **Cepas bacterianas e condições de crescimento**

A lista das 38 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela 1. As espécies bacterianas avaliadas foram selecionadas segundo sua associação com diferentes tipos de

doenças ou saúde periodontal (SOCRANSKY et al., 1998). Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo Mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em meio adequado, a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub>). A maioria das espécies foi cultivada em ágar triptone soja (Difco) com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA), e este suplementado quando necessário. A espécie *T. forsythia* foi cultivada neste meio acrescido de 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram cultivadas neste meio acrescido de 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivadas em caldo Mycoplasma (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose (Sigma), 400µg/ml de niaciamida (Sigma), 150µg/ml espermina tetrahydroclorídrica (Sigma), 20µg/ml de isobutirato de Sódio (Sigma), 1mg/ml de L-cisteína (Sigma), 5µg/ml de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

### **Isolamento do DNA e preparo das sondas**

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de placas de ágar-sangue, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo de cultura, por 3 a 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 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.000 g x por 10 minutos. Em seguida, as células das cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) (Labsynth) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). As células de bactérias Gram-positivas foram suspensas em 150µl tampão TE (pH 8,0). e lisadas após a adição de 15mg/ml de lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma). O DNA foi isolado e purificado como descrito por SMITH et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 38 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do random primer digoxigenin labeling kit (Roche, EUA), de acordo com o método descrito por FEINBERG e VOGELSTEIN (1983).

### **Hibridação DNA-DNA**

Foram determinados os níveis, prevalências e proporções das diferentes espécies nas amostras de placa subgengival dos 12 indivíduos com periodontite agressiva e nos 30 saudáveis, utilizando-se a técnica da Hibridação DNA-DNA (Checkerboard DNA-DNA Hybridization). As suspensões contidas nos tubos (tubo 1) 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 placa bacteriana contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot 30* (Immunitics, Cambridge, MA, USA), sendo assim, transferidas para membrana de nylon (15 x 15cm) com carga positiva

(Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas canaletas do *Minislot 30* (Immuntics) 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 30* (Immuntics) e o DNA foi fixado por meio de aquecimento em forno a  $120^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

A membrana foi pré-hibridizada a  $42^\circ\text{C}$ , por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5 x tampão salina citrato - SSC (1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Labsynth) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Sigma).

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter 45* (Immuntics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas de DNA das amostras e controle perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter 45* (Immuntics) foi adicionada uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130  $\mu\text{l}$  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 hibridação foi realizada por um período mínimo de 20 horas, a  $42^\circ\text{C}$ .

## **Detecção das espécies**

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetics) e lavada por 40 minutos a 65°C numa solução estrigente composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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 maléico (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, mantida 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 submetida a lavagem por 2 vezes, por 20 minutos, com 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 MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5.

Para a detecção dos sinais, a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora a base de fosfatase alcalina, *CDP-Star™ Detection Reagent* (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções reveladoras e fixadoras utilizadas foram da marca Kodak, mantidas à temperatura de 20°C.

**Tabela 1.** Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies foram ordenadas de acordo com os complexos descritos por SOCRANSKY et al. 1998

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

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection)

<sup>b</sup> Forsyth Institute, Boston, MA, USA.

€: sondas preparadas com as espécies *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a (43718<sup>a</sup>) e o *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b (29523<sup>a</sup>).

£: sondas preparadas com as espécies *P. acnes* I (11827<sup>a</sup>) e com *P. acnes* II (11828<sup>a</sup>)

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda correspondente a amostra de biofilme foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo  $10^5$  e  $10^6$  bactérias, utilizando os códigos descritos na Tabela 2. Estes registros foram então utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas por amostra coletada.

**Tabela 2.** Códigos utilizados para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de placa subgengival, após exame visual dos sinais observados para cada amostra e comparação com controles em filmes radiográficos obtidos após a hibridação DNA-DNA.

ÍNDICE	NÍVEL DO MICRORGANISMO
0	Não detectado
1	Menos de $10^5$ células
2	Aproximadamente $10^5$ células
3	Entre $10^5$ e $10^6$ células
4	Aproximadamente $10^6$ células
5	Mais de $10^6$ células

## **3.5.2 Análise da microbiota por sequenciamento do gene *16S rRNA***

### **3.5.2.1 Seleção dos sítios testes**

Os sítios foram selecionados de maneira aleatória, considerando o tipo de análise a ser realizada, sendo:

- a) Uma amostra com  $PS \geq 7\text{mm}$  de 10 indivíduos com doença periodontal agressiva, com o objetivo de analisar a diversidade bacteriana em indivíduos com PA.
- b) Uma amostra de um segundo sítio com  $PS \geq 7\text{mm}$  e um sítio com  $PS \leq 3\text{mm}$  sem sangramento a sondagem, com o objetivo de avaliar a diversidade bacteriana entre sítios dentro do mesmo indivíduo.
- c) Uma amostra de um sítio já seqüenciado, com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do método.

### **3.5.2.2 Extração de DNA**

O tubo (tubo 2) contendo 50  $\mu\text{l}$  da amostra foi utilizado para extração do DNA segundo o método descrito por DEWHIRST et al. (2000). Após o descongelamento da amostra, foram adicionados 1  $\mu\text{l}$  de solução de proteinase K em uma concentração de 200mg/ml (Sigma) e 5  $\mu\text{l}$  de solução de Tween 20 a 5%. A amostra foi aquecida a 55 °C durante 2hs e posteriormente a 95 °C por 10 minutos para inativação da Proteinase K em um termociclador (Gen Amp PCR System 2400, Applied Biosystems, California, EUA).



### **3.5.2.3 Amplificação da região 16S *rRNA* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**

O DNA das amostras foi utilizado como molde na reação em cadeia da polimerase padrão para amplificação da região 16S *rRNA* utilizando os iniciadores universais modificados para organismos procariotas do domínio Bactéria propostos por PASTER et al. (2001).

Os oligonucleotídeos apresentam as seguintes seqüências:

forward primer 9F 5'-GAG TTT GAT YMT GGC TCA G-3'

reverse primer 1525R 5'-GAA GGA GGT GWT CCA DCC-3'

Para cada reação de amplificação da região 16S *rRNA* de microrganismos procariotas foram utilizados: 1µl de DNA molde, 0,5µl de Platinum Taq polimerase (5 unidades/µl, Invitrogen), 5 µl de tampão (10X), 4µl de dNTPs (10nM) , 1µl de uma solução de cada iniciador (25 pmoles), 1,5 µl de cloreto de magnésio (50 mM) e 36 µl água Milli Q estéril q.s.p. para uma solução final de 50 µl.

As reações de amplificação para microrganismos do domínio Bactéria foram realizadas segundo as seguintes condições (PASTER et al., 2001): desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguindo-se 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 90 segundos, com 1 segundo adicional para cada ciclo e uma extensão final de 15 minutos a 72°C em termociclador (Gen Amp PCR System 2400, Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Os produtos da reação de PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, em tampão Tris Acetato EDTA

(TAE, Tris acetato a 40mM, ph 8,5; EDTA a 2mM) e corados com brometo de etídio. Os fragmentos específicos contendo 1500 pb foram visualizados e documentados sob luz ultravioleta.

#### **3.5.2.4 Clonagem**

Após a determinação da presença do amplicom, descritos no item - Amplificação da região 16S *rRNA* pela reação em cadeia da polimerase - estes foram clonados em *E. coli*. Para a clonagem foi utilizado o kit comercial TOPO TA Cloning - Version P (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

Os produtos obtidos foram ligados ao vetor TOPO. A seguir, as células quimiocompetentes de *E.coli* TOPO foram transformadas por choque térmico e meio S.O.C. (2% Triptone, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCL, 2,5 mM KCL, 10mM MgCL<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose) foi adicionado em seguida. As células foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Luria-Bertani acrescido de 50µg/ml de Canamicina e posteriormente incubadas a 37° C por 24hs. As colônias recombinantes foram transferidas para tubos contendo 40 µl de tampão TE e mantidas em a -70°C até o momento do processamento.

Foram selecionadas 96 colônias por amostra clonada e em seguida foi realizada uma reação de PCR contendo 1 µl de cada amostra para determinar o tamanho correto dos insertos. Para cada reação de amplificação da região 16S *rRNA* de microrganismos procarionotas foram utilizados forward *primers* M13 (-40) e M13 reverse primer (KIT TOPO). As condições da reação foram as mesmas já descritas no item - Amplificação da região 16S *rRNA* pela reação em cadeia da polimerase. Os produtos da reação de PCR foram submetidos à corrida

eletroforética em gel de agarose a 1%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE, Tris acetato 40mM, pH 8,5; EDTA 2mM) e corados com brometo de etídio. Os fragmentos específicos foram visualizados e documentados sob luz ultravioleta. Após a amplificação do fragmento, os produtos das reações *16S rRNA* foram purificados por meio do Microcon 100 (Amicon) e a seguir pelo QIAquick PCR purification kit (Qiagen).

### **3.5.2.5 Sequenciamento**

Após a purificação dos produtos das reações *16S rRNA* conforme o item 3.5.9, foram realizadas reações utilizando o kit de sequenciamento ABI Prism (BigDye Terminator Cycle Sequencing kit with AmpliTaq DNA Polymerase FS; Perkin-Elmer). Os *primers* que foram utilizados para o sequenciamento já foram descritos anteriormente no item - Amplificação da região *16S rRNA* pela reação em cadeia da polimerase (PASTER et al., 2001). Foram utilizadas as bases fluorescentes (Big Dye) com 80 µM de *primers* e como DNA molde 1 µl do produto de PCR purificado em volume total de 20µl por reação. Os ciclos de sequenciamento foram realizados no seqüenciador ABI 9700 PCR (AME Bioscience Ltd, Norway), com 25 ciclos de desnaturação a 96 °C (10s) e anelamento e extensão a 60 °C (4 minutos). Os segmentos de DNA obtidos durante o processo de sequenciamento foram analisados com o auxílio do seqüenciador ABI 377 DNA (DNASTAR Inc, Madison, EUA).

### **3.5.2.6 Análise dos dados dos 16S rRNAs seqüenciados**

Cerca de 96 clones de cada amostra com o tamanho certo do inserto em 12 amostras provenientes de 10 indivíduos com periodontite agressiva foram analisados. Uma seqüência de aproximadamente 500 pares de base foi obtida por clone para determinar e identificar a posição filogenética do microrganismo (PASTER et al., 2001). A seqüência de DNA obtida foi comparada com seqüências 16S rRNA em banco de genes (GenBank). Os dados foram inseridos em um software (TREECON, Microsoft Windows) e árvores filogenéticas (dendrograma) foram construídas segundo a metodologia preconizada por PASTER e DEWHIRST (1988). As matrizes de similaridade foram corrigidas para a mudança de bases pelo método descrito por JUKES e CANTOR (1969). Matrizes de similaridade foram construídas a partir do alinhamento das seqüências e da posição filogenética.

## **3.6 Análise Estatística**

### **3.6.1 Análise clínica**

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 computadas para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. As diferenças dentro de cada grupo foram avaliadas utilizando o teste Mann–

Whitney. A diferença na distribuição do gênero foi avaliada utilizando o teste Qui-quadrado. A significância estatística foi estabelecida em 5%.

### **3.6.2 Análise microbiológica (Hibridação DNA-DNA)**

Os dados microbiológicos foram expressos em nível médio de cada espécie (contagem) em cada sítio. Estes níveis foram computados por sítio, por indivíduo e depois dentro de cada grupo. Diferenças entre os grupos em relação aos níveis médios, proporções de microrganismos e média de freqüência de sítios colonizados em nível de contagem  $\geq 10^6$  células bacterianas foram avaliadas por meio do teste de covariância GLM ajustado para a idade.

Diferenças existentes entre as diferentes categorias de bolsas dentro do mesmo indivíduo foram avaliadas por meio do teste Friedman. Os dados de profundidade de sondagem e os dados microbiológicos foram submetidos à correlação de Pearson.

A significância estatística foi estabelecida em 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, como proposto por SOCRANSKY et al. (1991). Foi aplicada a fórmula  $0,05 = 1 - (1-k)^{38}$ , onde k é o valor equivalente ao  $p < 0,05$  quando ajustado para a comparação de 38 bactérias. Desta forma, as diferenças detectadas no presente estudo foram consideradas significativas quando  $p < 0,002$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados clínicos

Neste estudo foram analisados pacientes com periodontite agressiva (PA) e indivíduos com periodontal normal (S). A Tabela 3 apresenta os dados epidemiológicos e os valores médios dos parâmetros clínicos dos indivíduos nos dois grupos experimentais. Os grupos foram homogêneos em relação à distribuição do gênero (teste Qui-quadrado,  $p > 0,05$ ). O grupo S apresentou média de idade significativamente superior comparado ao grupo PA. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos para as variáveis clínicas de média de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção e para o percentual de sítios com sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração. O grupo PA apresentou maiores médias para estes parâmetros clínicos comparado com o grupo S. O percentual de placa visível foi semelhante entre os dois grupos estudados.

Uma descrição mais detalhada dos parâmetros clínicos dos indivíduos portadores de doença periodontal agressiva está apresentada na Tabela 4. Foram avaliados clinicamente 1937 (6 sítios para cada elemento dental; ver item 3.2.-Avaliação Clínica). De acordo com a Profundidade à Sondagem, os sítios foram categorizados em sítios rasos ( $PS \leq 3\text{mm}$ ), sítios intermediários ( $PS 4-6\text{mm}$ ) e sítios profundos ( $PS \geq 7\text{mm}$ ). Em relação ao Nível Clínico de Inserção, este parâmetro foi categorizado em perdas leves ( $NCI \leq 3\text{mm}$ ), perdas moderadas ( $NCI 4-6\text{mm}$ ) e perdas avançadas ( $NCI \geq 7\text{mm}$ ). Nota-se que apenas 40,7% dos sítios examinados nos indivíduos do grupo PA

apresentavam bolsas rasas e 40,0% perda de inserção leve. Os demais sítios estavam distribuídos entre bolsas intermediárias e profundas (39,5% e 19,8%, respectivamente) e perdas de inserção clínica moderadas e avançadas (39,5% e 20,5%, respectivamente).

**Tabela 3.** Média ( $\pm$ DP) dos parâmetros demográficos e clínicos para os indivíduos periodontalmente saudáveis e portadores de doença periodontal agressiva.

Variáveis	Saúde Periodontal N=30	Doença Periodontal Agressiva N=12
Idade *	41,10 $\pm$ 8,5 30-46	26,00 $\pm$ 3,0 20-29
Gênero (F/M)	20/10	9/3
Profundidade de sondagem *	2,16 $\pm$ 0,2	4,72 $\pm$ 0,75
Nível clínico de inserção *	2,20 $\pm$ 0,2	4,65 $\pm$ 1,14
% sítios		
Índice de placa visível	43,74 $\pm$ 17,8	53,30 $\pm$ 14,8
Índice gengival *	6,52 $\pm$ 5,5	14,20 $\pm$ 11,0
Sangramento à sondagem *	27,73 $\pm$ 20,5	69,90 $\pm$ 16,2
Supuração *	0,0	4,21 $\pm$ 3,19

\* Teste U Mann-Whitney; \*p<0,05  
M=masculino; F=feminino

**Tabela 4.** Freqüências médias de sítios de acordo com diferentes categorias de Profundidade à Sondagem e Nível Clínico de Inserção no grupo Periodontite Agressiva (PA).

Variáveis	Doença Periodontal Agressiva n=12
Número de sítios examinados	1.937
% sítios (n) com	
Profundidade de sondagem (PS)	
PS ≤ 3 mm	40,7 % (788)
PS = 4-6mm	39,5% (765)
PS ≥ 7mm	19,8% (384)
Nível Clínico de Inserção (NCI)	
NCI ≤ 3 mm	40,0% (783)
NCI = 4-6mm	39,5 % (765)
NCI ≥ 7mm	20,5 % (389)

## 4.2 Análise microbiológica

### 4.2.1 Hibridação DNA-DNA

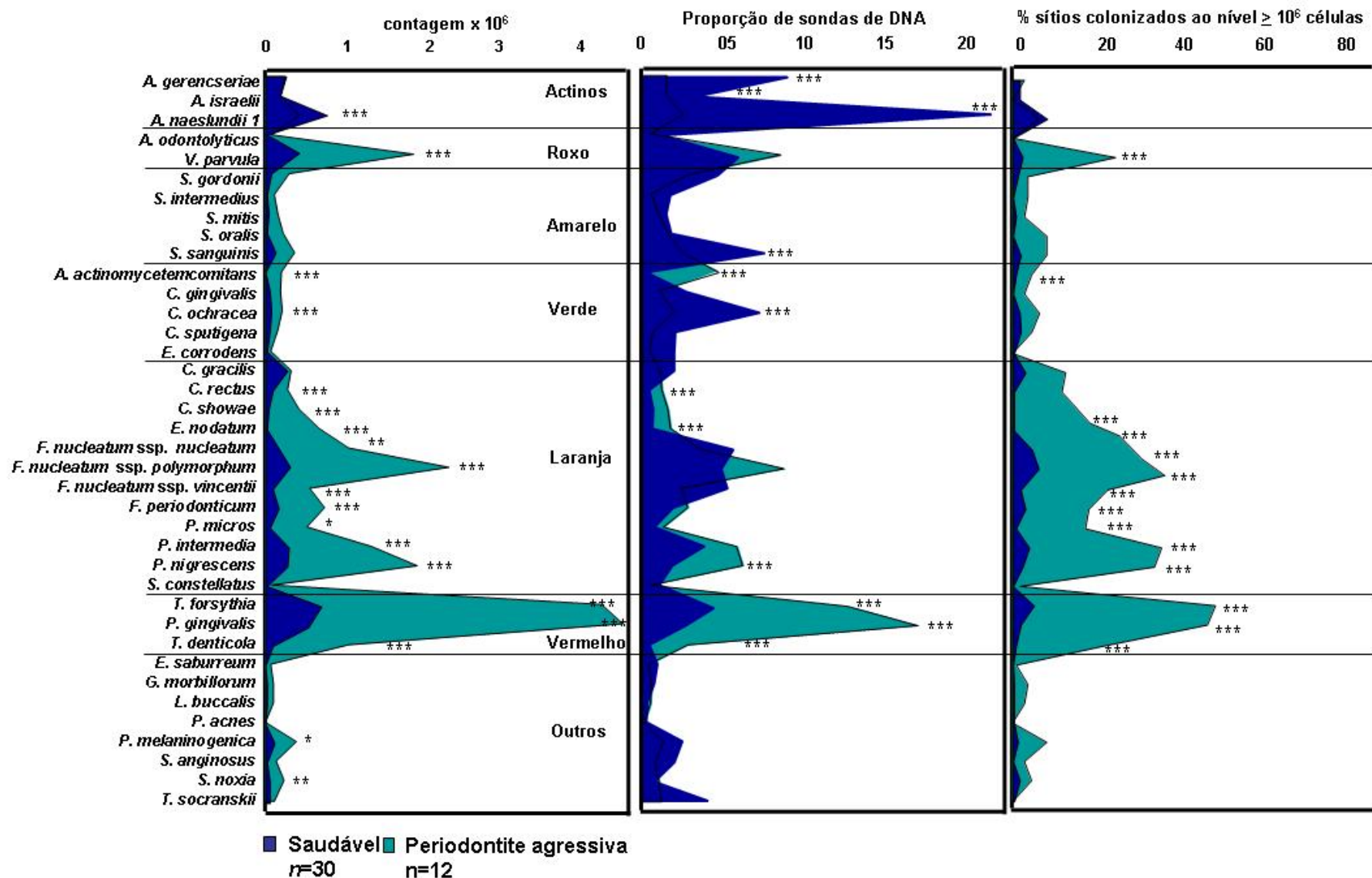
***Médias de contagem ( $\times 10^6$  células), da proporção de sondas de DNA e do percentual de sítios com contagens iguais ou superiores a  $10^6$  células bacterianas/amostra***

As médias de contagem ( $\times 10^6$  células), da proporção de sondas de DNA e o porcentual de sítios colonizados pelas espécies ao nível  $\geq 10^6$  células frente às 38 espécies bacterianas analisadas em amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis e 12 indivíduos com periodontite



agressiva estão apresentados na Figura 1. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por SOCRANSKY et al. (1998).

Os níveis de contagem de 19 espécies foram significativamente diferentes entre os grupos PA e S após o ajuste para comparações múltiplas (SOCRANSKY et al. 1991) e para a idade. Destas, *Veillonella parvula*, *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga ochracea*, *C. rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii*, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella melaninogenica* e *Selenomonas noxia* foram detectados em níveis superiores no grupo PA, enquanto *Actinomyces naeslundii* 1 foi detectado em níveis superiores no grupo S ( $p < 0,001$ ). Considerando as proporções destas espécies, *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii* 1, *Streptococcus sanguinis* e *C. ochracea* apresentaram proporções significativamente superiores nas amostras dos indivíduos com saúde periodontal ( $p < 0,001$ ). Já as espécies *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *P. nigrescens*, *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* foram encontradas em proporções significativamente superiores no grupo PA. O percentual de sítios colonizados com níveis  $\geq 10^6$  foi significativamente superior no grupo PA para 14 espécies bacterianas. As principais diferenças foram observadas nas espécies dos complexos laranja e vermelho. Vale destacar que



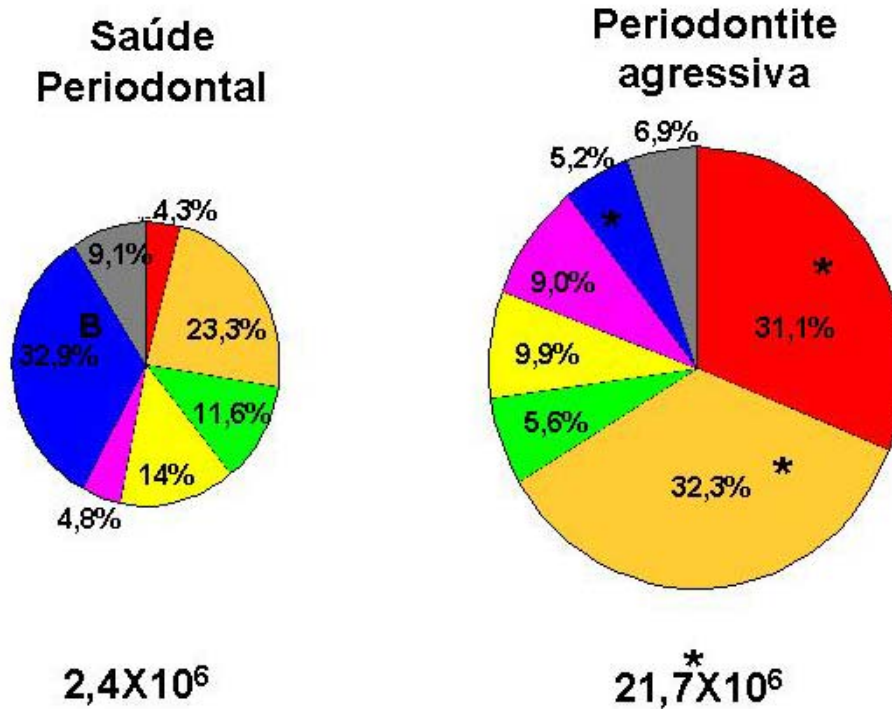
**Figura 1.** Perfil microbiano das médias de contagem (x10<sup>6</sup> células), da proporção das sondas de DNA e do percentual de sítios colonizados das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Análise de covariância ajustada para idade: \* p<0,05; \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas segundo SOCRANSKY et al. (1991).

*A. actinomycetemcomitans* foi detectado em contagens, proporções e percentual de sítios colonizados superiores no grupo PA quando comparado ao grupo de indivíduos com saúde periodontal.

### ***Proporções dos complexos microbianos***

As proporções dos complexos microbianos estão apresentadas na Figura 2. A área do gráfico foi ajustada para refletir a diferença da contagem total de bactérias nas amostras de biofilme subgengival entre os grupos. As espécies bacterianas identificadas por meio de 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. A contagem total das 38 espécies bacterianas subgengivais foi de  $21,7 \times 10^6$  para o grupo PA e  $2,4 \times 10^6$  para o grupo S, sendo que estes resultados foram significativamente diferentes entre os grupos ( $p < 0,01$ ). Os complexos vermelho (32,3%) e laranja (31,1%) apresentaram proporções superiores no grupo PA ( $p < 0,01$ ) em comparação aos indivíduos periodontalmente saudáveis (4,3% e 23,3%, respectivamente). O grupo PA apresentou uma média de proporção significativamente inferior de *Actinomyces sp.* (5,2%) em comparação ao grupo S (32,9%). Somando-se os complexos que abrigam a maioria dos patógenos (vermelho e laranja) e aqueles que abrigam as espécies compatíveis com o hospedeiro (amarelo, roxo, verde e azul), houve uma grande divergência entre os grupos. Nos indivíduos com periodontite agressiva os patógenos somaram 63,4% e os benéficos 29,7% da

microbiota avaliada; enquanto que nos indivíduos com saúde periodontal essas proporções foram de 27,6% e 63,3%, respectivamente.



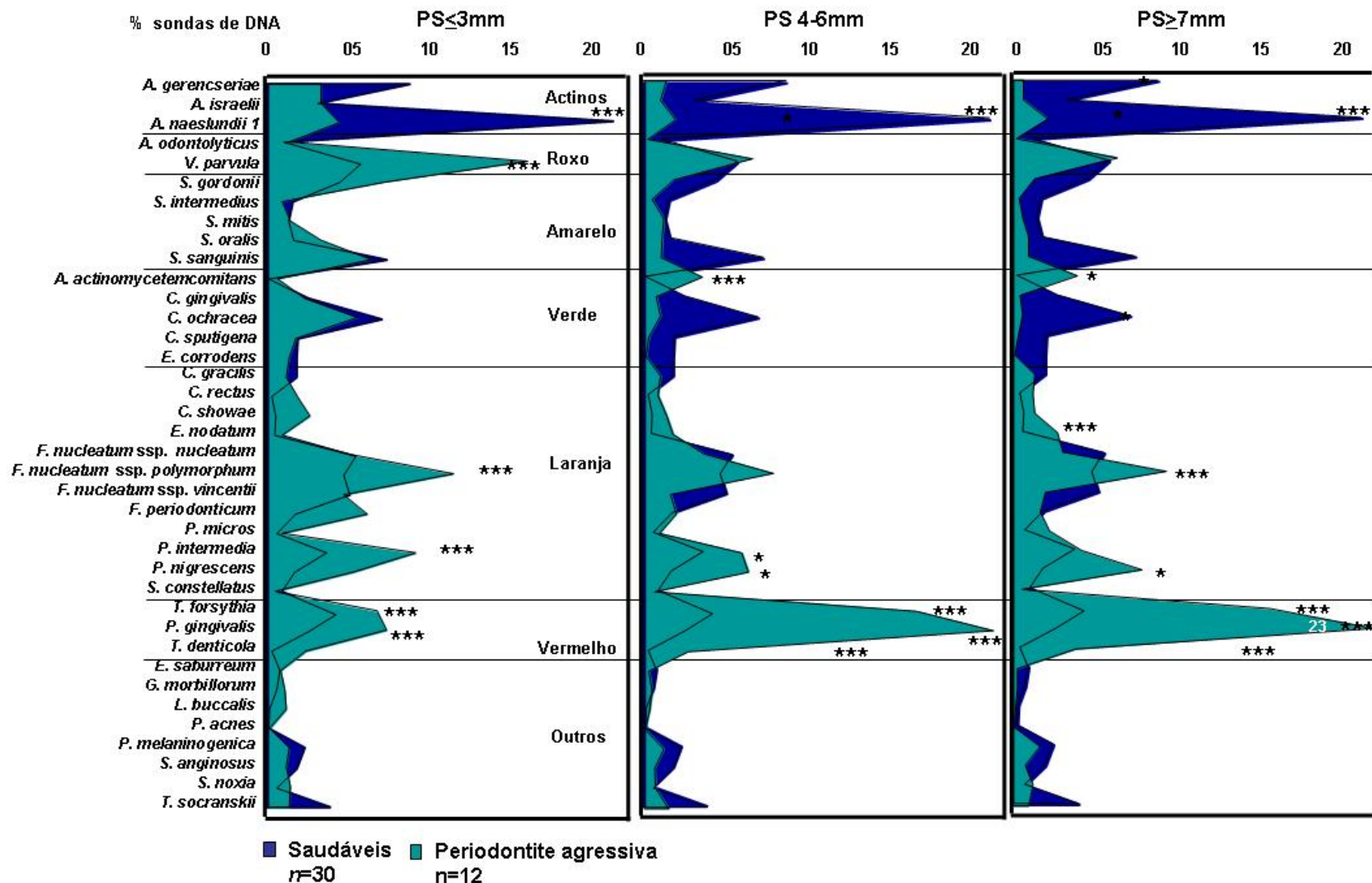
**Figura 2.** Média da contagem total ( $\times 10^6$ ) e média das proporções dos complexos microbianos descritos por SOCRANKY et al. (1998), presentes nas amostras de placa subgingival dos indivíduos nos grupos PA e S. O grupo azul é constituído por 3 espécies de Actinomyces. A área dos gráficos foi ajustada para refletir a diferença da contagem total de bactérias entre os dois grupos experimentais. Análise de covariância ajustada para idade (\* $p < 0,01$ ).

### **Sítios categorizados de acordo com a profundidade de sondagem**

Com a finalidade de fazer uma avaliação mais detalhada do perfil microbiológico dos diferentes grupos experimentais, os sítios dos grupos PA foram subdivididos em 3 categorias de profundidade de sondagem: rasos ( $\leq 3$ mm), intermediárias (4-6 mm) e profundas ( $\geq 7$ mm).

A análise estatística foi repetida, ou seja, os dados foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, subdivididos em cada categoria de bolsa. Como os indivíduos pertencentes ao grupo S possuem apenas sítios rasos, os resultados foram repetidos em todas as categorias de profundidade de sondagem a fim de tornar possível a comparação entre os dois grupos.

A Figura 3 apresenta a média de proporção das sondas de DNA nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis e 12 indivíduos com periodontite agressiva, nas diferentes categorias de profundidade de sondagem. *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. intermedia* foram encontrados em proporções elevadas em todas as categorias de profundidade de sondagem do grupo PA, enquanto *A. naeslundii* 1 foi encontrado em proporções superiores nos indivíduos periodontalmente saudáveis. Outras diferenças significantes foram observadas no grupo PA, incluindo altas proporções de *V. parvula* e *F. nucleatum* ssp. *polymorphum* em sítios rasos; *A. actinomycetemcomitans*, *E. nodatum*, *F. nucleatum* ssp. *polymorphum* e *T. denticola* em sítios profundos.



**Figura 3.** Perfil microbiano das médias da proporção das sondas de DNA das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis (sítios com profundidade de sondagem PS ≤ 3mm) e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada (sítios separados por categoria de profundidade de sondagem – PS, sendo rasos: ≤3mm, intermediários: 4-6mm e profundos: ≥7mm). Análise de covariância ajustada para idade: \* p<0,05; e \*\*\* p<0,001. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas segundo SOCRANSKY et al. (1991).

#### 4.2.2 Correlações clínicas e microbiológicas

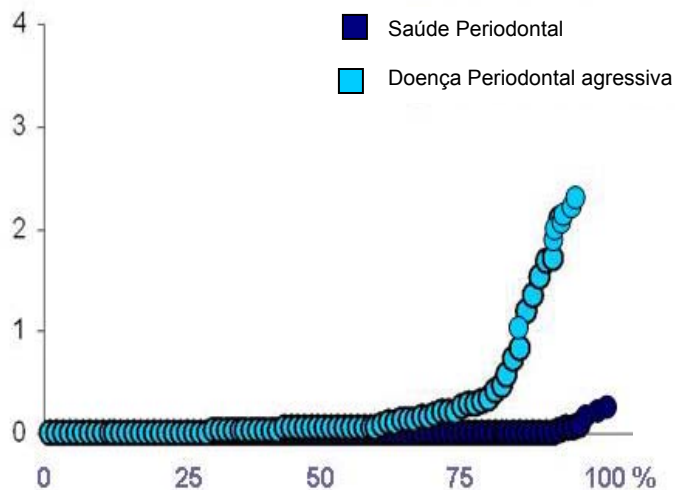
A dispersão da proporção de *A. actinomycetemcomitans* presente nos diferentes sítios analisados nos indivíduos periodontalmente saudáveis e com doença periodontal agressiva e a correlação de Pearson entre a proporção de *A. actinomycetemcomitans* e a profundidade de sondagem está apresentada na Figura 4A e 4B. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em baixas proporções nos sítios dos indivíduos periodontalmente saudáveis. Em 85,1% dos sítios esta espécie não foi detectada, e naqueles positivos, a maior proporção foi de 0,41% (Figura 4A).

Entre 108 sítios dos indivíduos com doença periodontal agressiva, 22,2% não apresentavam *A. actinomycetemcomitans*, sendo que a proporção de *A. actinomycetemcomitans* variou entre 0,01% nos seus níveis mais baixos e 2,6% em seus níveis mais elevados (Figura 4A). Foi observada ausência de correlação (Pearson) entre a proporção de *A. actinomycetemcomitans* nos sítios dos indivíduos portadores de doença periodontal agressiva e a profundidade de sondagem ( $r=0,301$ ;  $p=0,092$ ; Figura 4B).

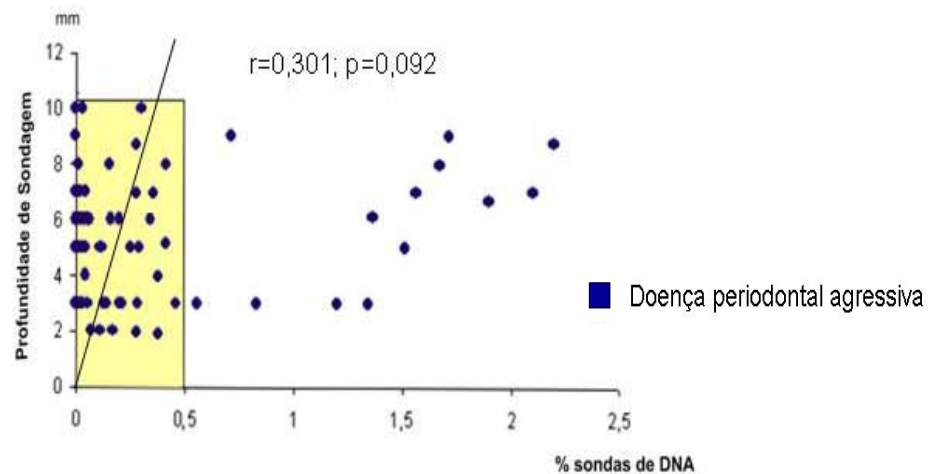
Nota-se na Figura 4B que mesmo em bolsas profundas, a proporção de *A. actinomycetemcomitans* na grande maioria dos sítios analisados não ultrapassou 0,5% da microbiota analisada.

### *A. actinomycetemcomitans*

% sondas de DNA



A



B

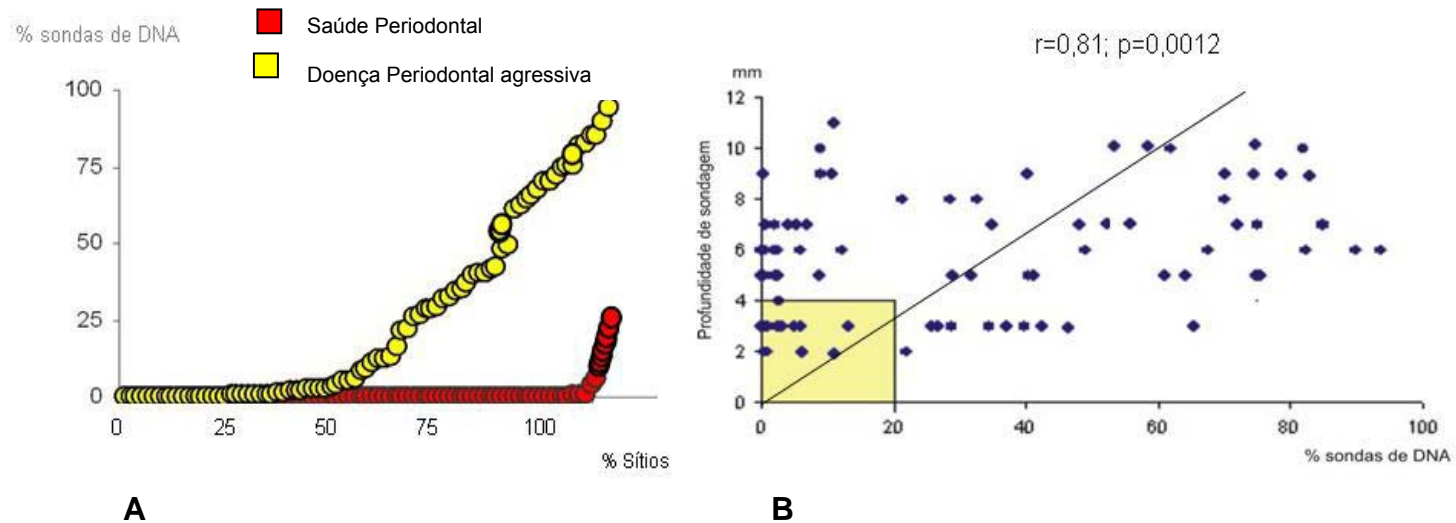
**Figura 4A e 4B.** Gráfico de dispersão da proporção de *A. actinomycetemcomitans* distribuídos nos diferentes sítios analisados nos indivíduos periodontalmente saudáveis e com doença periodontal agressiva e a correlação de Pearson entre a proporção de *A. actinomycetemcomitans* nos indivíduos com doença periodontal agressiva e a profundidade de sondagem.



A dispersão da proporção do complexo vermelho distribuído nos diferentes sítios analisados nos indivíduos com saúde periodontal e com doença periodontal agressiva e a correlação de Pearson entre a proporção deste complexo e a profundidade de sondagem estão apresentadas na Figura 5A e 5B. As proporções das espécies pertencentes a este complexo, *P.gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, em cada sítio foram somadas, depois entre cada indivíduo e posteriormente dentro de cada grupo. Foi observada correlação de Pearson significativa entre a proporção das espécies do complexo vermelho somadas nos sítios dos indivíduos portadores de doença periodontal agressiva e a profundidade de sondagem ( $r=0,81$ ;  $p=0,0012$ , Figura 5B). Nota-se que com o aumento da profundidade de sondagem ocorreram também um aumento na proporção deste complexo.

Os valores médios das proporções e das contagens ( $\times 10^6$  células) das 38 espécies subgingivais avaliadas nos indivíduos portadores de periodontite agressiva em sítios rasos ( $PS \leq 3\text{mm}$ ), intermediários ( $PS = 4-6\text{mm}$ ) e profundos ( $PS \geq 7\text{mm}$ ) estão apresentados na Figura 6. As proporções e os níveis de contagem das espécies pertencentes em cada sítio foram somadas, depois entre cada indivíduo e posteriormente dentro do grupo. Os níveis de contagem ( $\times 10^6$ ) de 5 espécies foram estatisticamente diferentes entre as categorias de profundidade de sondagem. Além disso, a proporção média de 7 espécies foram significativamente diferentes entre as categorias de profundidade de sondagem.

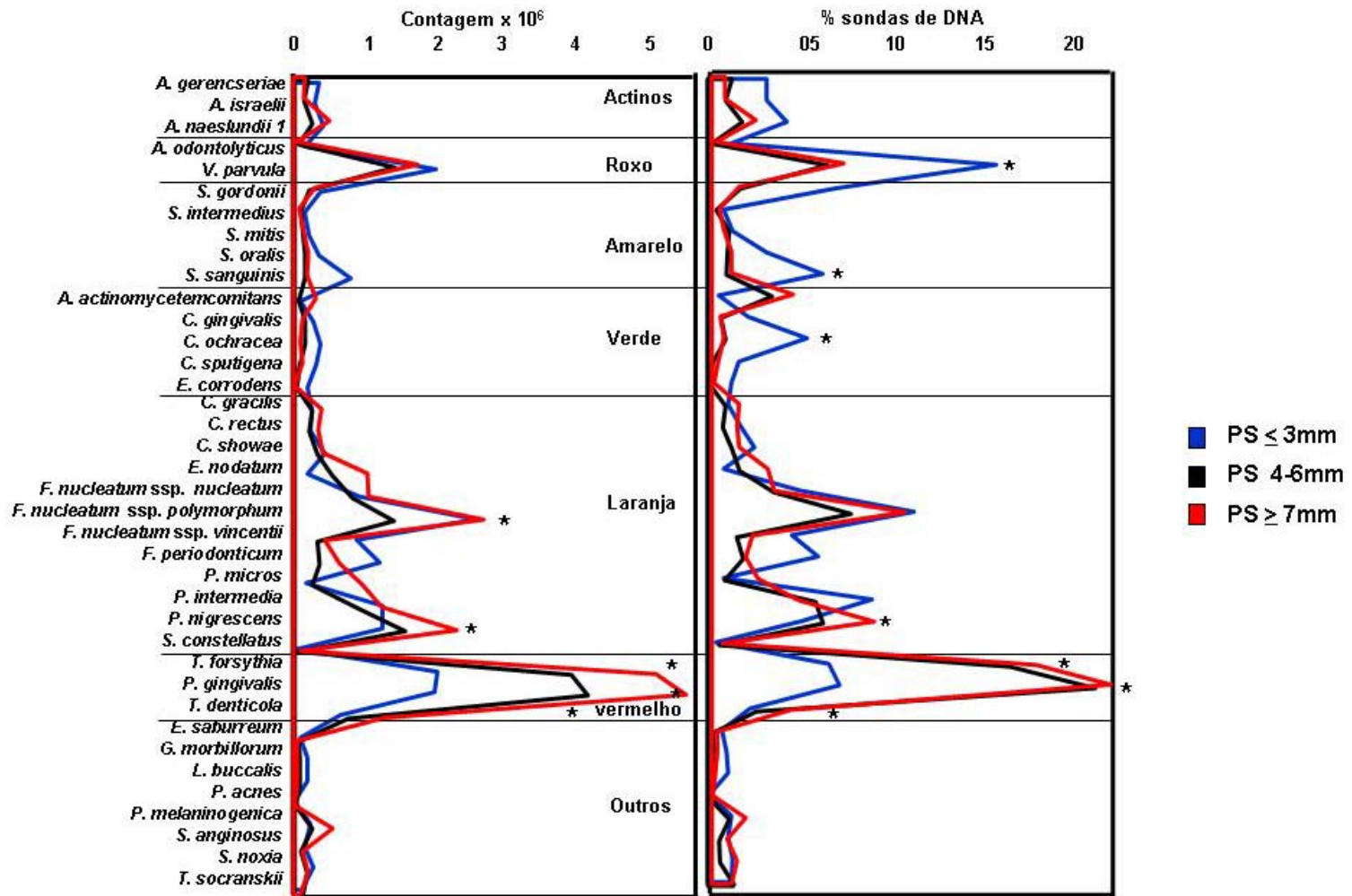
COMPLEXO VERMELHO  
*P.gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*



**Figura 5A e 5B.** Gráfico de dispersão da proporção do complexo vermelho distribuído nos diferentes sítios analisados nos indivíduos com saúde periodontal e com doença periodontal agressiva e a correlação de Pearson entre a proporção deste complexo e a profundidade de sondagem nos indivíduos com doença periodontal agressiva. As proporções das espécies pertencentes a este complexo, *P.gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, em cada sítio foram somadas individualmente, depois entre cada indivíduo e posteriormente dentro de cada gupo.

As proporções dos 3 patógenos do complexo vermelho foram mais elevadas em bolsas profundas e intermediárias comparadas às bolsas rasas. As proporções médias de *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* foram de  $17,4 \pm 10,1$ ,  $23,3 \pm 11,2$  e  $4,9 \pm 2,7$  respectivamente, na categoria de bolsas profundas;  $15,5 \pm 9,7$ ,  $17,8 \pm 12,9$  e  $3,6 \pm 2,8$  na categoria de bolsas intermediárias; e de  $5,4 \pm 6,0$ ,  $6,0 \pm 5,2$  e  $1,9 \pm 1,9$  na categoria de bolsas rasas. As proporções de 3 espécies correlacionadas com saúde periodontal, uma do complexo roxo (*V. parvula*), uma do complexo amarelo (*S. sanguinis*) e uma do complexo verde (*C. ochracea*), foram maiores em amostras de bolsas rasas do que em amostras de bolsas intermediárias e profundas.

Os microrganismos que se apresentaram em níveis de contagem mais elevados em bolsas profundas foram 2 espécies do complexo laranja (*F. nuc. ss. polymorphum* e *P. nigrescens*;  $2,7 \times 10^6$  e  $2,3 \times 10^6$  células, respectivamente) e 2 espécies do complexo vermelho (*T. forsythia* e *P. gingivalis*,  $5,0 \times 10^6$  e  $5,3 \times 10^6$ ).



**Figura 6.** Gráfico de área das médias das proporções e dos níveis de contagem das 38 espécies bacterianas avaliadas nas amostras de biofilme subgengival nos indivíduos portadores de periodontite agressiva em bolsas rasas (PS  $\leq$  3mm), bolsas intermediárias (PS= 4-6mm) e bolsas profundas (PS  $\geq$  7mm). Teste Friedman (\* $p < 0,05$ ). Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas segundo SOCRANSKY et al. (1991).

### **4.2.3 Análise da microbiota por sequenciamento do gene *16S rRNA***

Com o objetivo de estudar a diversidade bacteriana presente nas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos portadores de doença periodontal agressiva foi realizado o sequenciamento de amplicons *16S rRNA*. Nesta fase foram selecionadas aleatoriamente 10 amostras de biofilme subgengival de sítios com profundidade de sondagem  $\geq 7$ mm de 10 indivíduos portadores de doença periodontal agressiva.

A Figura 7 apresenta os produtos da reação de amplificação da região do gene *16S rRNA* com o tamanho aproximado de 1.500pb, que posteriormente foram clonados e seqüenciados. O total de 1.094 clones foi sequenciado, sendo que o número de clones *16S rRNA* por amostra variou entre 71 e 96 clones, com uma média de 84 clones analisados por amostra e um desvio padrão de 7,9 clones. Foram identificadas 156 diferentes espécies bacterianas. O Anexo 4 apresenta a lista de freqüências e proporção de todas as espécies identificadas baseadas na sequência do gene *16S rRNA* nas 12 amostras (13 reações, ver item 3.5.2.1 Seleção dos sítios testes) de biofilme subgengival de indivíduos portadores de doença periodontal agressiva estudadas

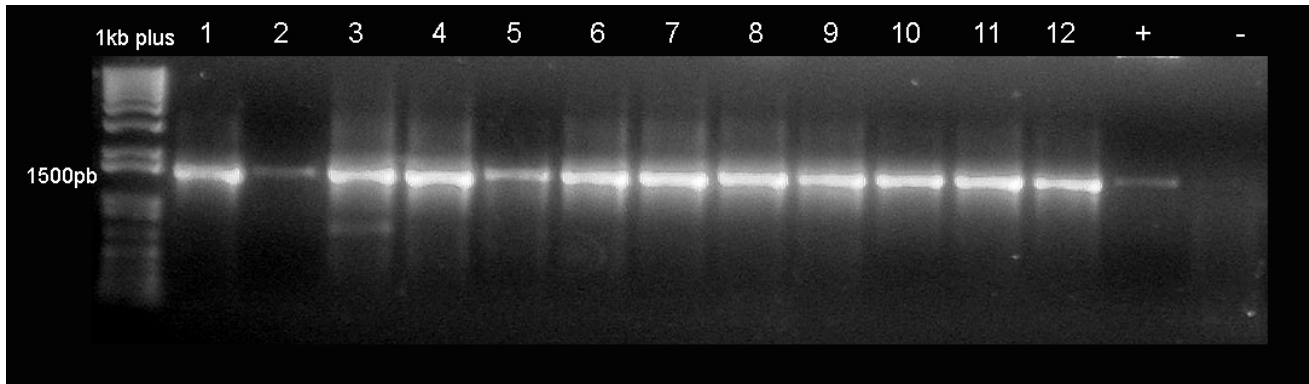
Para identificação das espécies bacterianas foram seqüenciados os primeiros 500 pb do gene *16S rRNA* (variação de 459 até 562pb). Estas seqüências foram comparadas com o banco de dados (BLAST, GenBank). Todos os clones obtidos apresentaram uma similaridade em torno de 99% com suas respectivas espécies, e então foram obtidas no banco de dados a sequência

completa dos genes *16SrRNA* (1.500pb) no banco de dados, e estas utilizadas para a construção das árvores filogenéticas (Figura 8 e 9).

Com o objetivo de estudar a diversidade bacteriana existente no biofilme subgengival do grupo com doença periodontal, 10 amostras foram selecionadas. Foram detectadas nestas amostras 120 espécies, 50 foram observadas apenas uma vez em um único indivíduo ( $120 - 50 = 70$ ), e foram excluídas da construção da árvore filogenética. Assim sendo, a Figura 8 apresenta a árvore filogenética construída com base na biblioteca gênômica das 70 espécies mais prevalentes obtidas por meio da clonagem de 10 amostras de biofilme subgengival de 10 indivíduos portadores de doença periodontal agressiva. Na árvore filogenética (figura 8) estão apresentados 71 ramos, pois estão apresentados *Dialister invisus* e *Dialister* sp. BS095, embora estes sejam considerados a mesma espécie, por apresentarem homologia em *16SrRNA* maior que 98,5%. Segundo análise do banco de dados, quarenta das 70 espécies, ou seja 57%, ainda não foram cultivadas e foram designadas como “clones”. As espécies identificadas pertencem a 4 diferentes filos: Firmicutes (*Streptococcus*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Selenomonas* e gêneros correlacionados), Espiroquetas (*Treponemas*), Actinobacteria (*Actinomyces* e gêneros correlacionados) e Bacteroidetes (*Porphyromonas* e *Capnocytophaga*).

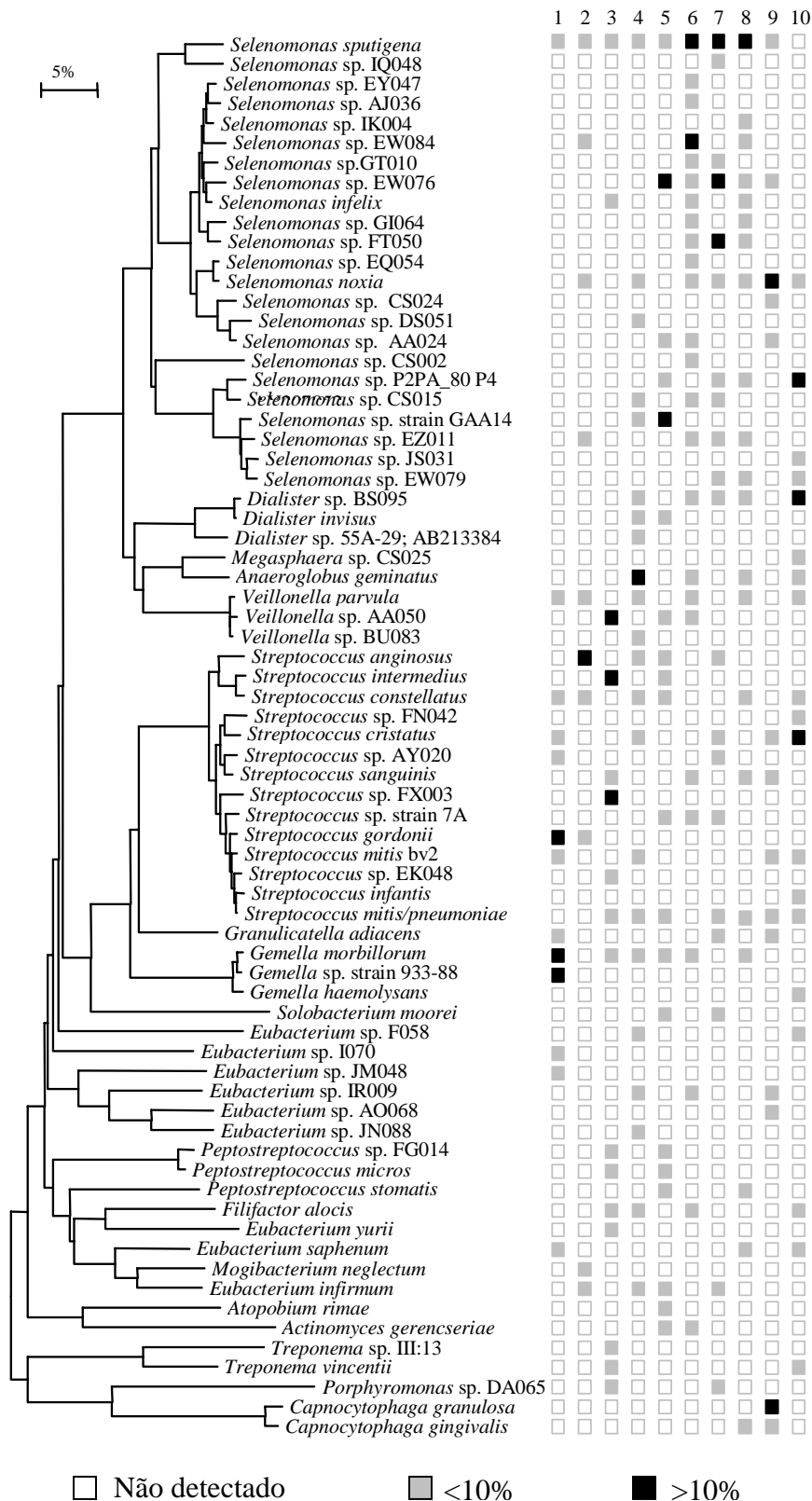
Foram observadas diferenças no perfil bacteriano detectado em amostras de diferentes indivíduos, e estas estão apresentadas na Figura 8. Espécies de *Selenomonas* e *Streptococcus* foram encontradas em alta prevalência e proporção em todos os indivíduos. De uma maneira geral, 50% da biblioteca

genômica construída foi formada por estes dois gêneros. *Selenomonas sputigena* foi a espécie mais prevalente, sendo encontrada em 9 entre 10



**Figura 7.** Fotografia de gel de agarose (1%) em tampão TAE, onde os produtos das reações de amplificação de diferentes amostras clínicas (canaletas de 1-12) utilizando os iniciadores relacionados no item 2.5.9 foram submetidos a eletroforese e apresentam tamanho aproximado de 1.500pb. Em (+) Controle positivo - *E.coli* ATCC 33270; (-) Controle negativo; 1kb plus: Peso Molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

amostras, sendo que em 3 amostras (amostra 6, 7 e 8, Figura 8) esta espécie foi detectada em uma alta proporção variando de 19 a 30% da microbiota. Outras espécies de *Selenomonas* também estavam presentes em altos níveis, incluindo *S. noxia*, *Selenomonas* sp. EW084, *Selenomonas* sp. EW076, *Selenomonas* FT050, *Selenomonas* sp. P2PA\_80 e *Selenomonas* sp. strain GAA14. Espécies do gênero *Streptococcus* como *Streptococcus anginosus* (50 clones, 57%), *Streptococcus gordonii* (18 clones, 21%), *Streptococcus intermedius* (17 clones, 21%), *Streptococcus* sp. FX003 (9 clones, 11,1%) e *Streptococcus cristatus* (15 clones, 20%) foram encontradas em níveis elevados em 5 diferentes amostras (amostra 1, 4, 7, 9 e 10, Figura 8). Outras espécies predominantes foram *Dialister invisus*, *Anaeroglobus geminatus*, *Veillonella* sp. AA050, *Gemella morbillorum*, *Gemella* sp. strain 933-88 e *Capnocytophaga granulose* (Figura 8).



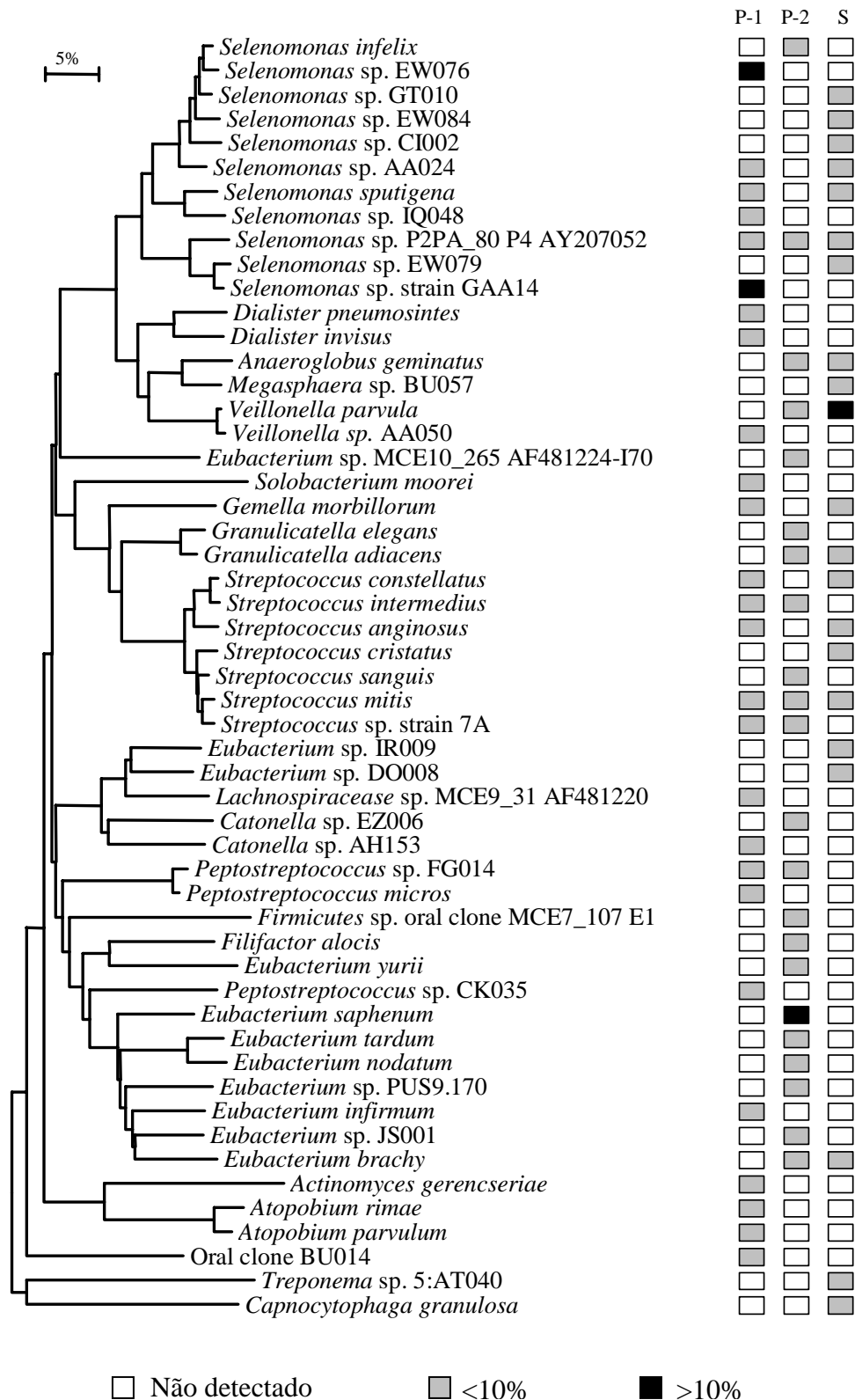
**Figura 8.** Árvore filogenética construída a partir da sequência de 1.500 pb do gene 16S *rRNA* das espécies mais prevalentes observadas na biblioteca genômica obtida por meio da clonagem de 10 amostras de biofilme subgengival de 10 indivíduos portadores de doença periodontal agressiva. Foram detectadas 70 diferentes espécies de bactérias. A barra superior representa a diferença de 5% na sequência genômica entre as espécies.



Com o objetivo de analisar a diversidade entre sítios dentro do mesmo indivíduo, os clones *16S rRNA* oriundos de amostras subgingivais de dois sítios com  $PS \geq 7\text{mm}$  e de um sítio com  $PS \leq 3\text{mm}$  que não apresentava sangramento à sondagem foram seqüenciados.

A Figura 9 apresenta a árvore filogenética construída a partir dos dados de *16SrRNA* obtidos de amostras de dois sítios profundos e de um sítio raso com características clínicas saudáveis do mesmo indivíduo. Vinte e uma espécies diferentes foram encontradas no sítio raso e 43 espécies foram encontradas nos sítios profundos. A espécie *V. parvula* foi encontrada em maior proporção no sítio raso e *Selenomonas* sp. EW076, *Selenomonas* sp. GAA14 e *Eubacterium saphenum* foram encontradas em níveis elevados nos sítios profundos. Apenas as espécies *Selenomonas* sp. P2PA\_80 e *Streptococcus mitis* foram encontradas nas 3 amostras do mesmo indivíduo.

Aleatoriamente a amostra 4 (Figura 8) foi selecionada para que a metodologia fosse realizada em duplicata, a fim de se observar a reprodutibilidade do método de amplificação e clonagem. A Tabela 5 apresenta a frequência e a proporção das espécies detectadas pela clonagem e sequenciamento da amostra em duplicata. Noventa e um clones foram seqüenciados com sucesso na primeira reação e 87 clones na segunda reação. Foram detectadas 35 espécies diferentes para ambas reações. Algumas diferenças foram observadas, incluindo 11 espécies que foram encontradas somente na reação 01 e outras 10 espécies que foram encontradas apenas na reação 02. Quatorze espécies foram detectadas em ambas as reações e muitas



**Figura 9.** Árvore filogenética construída a partir da sequência de 1.500 pb do gene *16S rRNA* das espécies observadas na biblioteca genômica obtida por meio da clonagem de 2 amostras de biofilme subgingival de sítios profundos (PS>7mm; P-1 e P-2) e de uma amostra de sítio raso (PS<3mm; S) de um mesmo indivíduo. A barra superior representa a diferença de 5% na sequência genômica entre as espécies.

delas apresentaram níveis semelhantes de prevalência, tais como: *Gemella morbilorum*, *A. geminatus*, *S. noxia*, *Selenomonas* sp. GA014, *Selenomonas sputigena*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Veillonella parvula/dispar*.

A principal diferença observada entre as duas reações realizadas com o mesmo molde de DNA (amostra 4, Figura 08) foi observada em relação à prevalência da espécie *Selenomonas genomosp.* C2, encontrada somente na reação 02 em uma alta prevalência (14,9%).

**Tabela 5.** Frequência e proporção das espécies encontradas pela clonagem e sequenciamento de uma amostra individual realizada em duplicata.

<b>Amostra 4 (reação 01)</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Amostra 4 (reação 02)</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<i>Dialister invisus</i>	2	2,2	<i>Dialister invisus</i>	5	5,7
<i>Dialister</i> sp. 55A-29	2	2,2			
<i>Dialister</i> sp. BS095	2	2,2	<i>Dialister</i> BS095	1	1,1
			<i>Dialister</i> GB027	2	2,2
<i>Eubacterium infirmum</i>	1	1,1			
			<i>Eubacterium saburreum</i>	2	2,2
<i>Eubacterium</i> sp. DO016	1	1,1	<i>Eubacterium</i> sp. DO016	1	1,1
<i>Eubacterium</i> sp. IR009	1	1,1	<i>Eubacterium</i> sp. IR009	1	1,1
<i>Eubacterium</i> sp. JN088	3	3,3			
			<i>Eubacterium</i> sp. BP2-88	2	2,2
<i>Filifactor alocis</i>	1	1,1			
<i>Firmicutes</i> sp. FO58	1	1,1	<i>Firmicutes</i> sp. FO58	1	1,1
			<i>Fusubacterium nucleatum</i>	1	1,1
<i>Gemella morbilorum</i>	8	8,8	<i>Gemella morbilorum</i>	5	5,7
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	30	33,0	<i>Anaeroglobus geminatus</i>	14	16,1
			<i>Peptostreptococcus</i> sp. FL008	1	1,1
			<i>Peptostreptococcus</i> sp. HE064	1	1,1
<i>Peptostreptococcus</i> sp. BS044	1	1,1			
			<i>Selenomonas genomosp.</i> C2	13	14,9
<i>Selenomonas noxia</i>	4	4,4	<i>Selenomonas noxia</i>	6	6,9
			<i>Selenomonas</i> sp. AA024	1	1,1
			<i>Selenomonas</i> EW076	2	2,2
<i>Selenomonas</i> sp. CS015	2	2,2			
<i>Selenomonas</i> sp. DS051	3	3,3			
<i>Selenomonas</i> sp. GA014	3	3,3	<i>Selenomonas</i> sp. GA014	4	4,6
<i>Selenomonas sputigena</i>	6	6,6	<i>Selenomonas sputigena</i>	8	9,2
<i>Shuttleworthia satelles</i>	1	1,1			
<i>Streptococcus anginosus</i>	3	3,3	<i>Streptococcus anginosus</i>	5	5,7
<i>Streptococcus constellatus</i>	3	3,3	<i>Streptococcus constellatus</i>	5	5,7
<i>Streptococcus cristatus</i>	2	2,2			
<i>Streptococcus mitis</i> bv2	1	1,1			
<i>Streptococcus mitis</i>	2	2,2	<i>Streptococcus mitis</i>	2	2,2
			<i>Streptococcus oralis</i>	1	1,1
<i>Veillonella parvula/dispar</i>	4	4,4	<i>Veillonella parvula/dispar</i>	3	3,3
<i>Veillonella</i> sp. BU083	4	4,4			
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>100</b>		<b>87</b>	<b>100</b>

## 5 DISCUSSÃO

O Encontro Internacional para classificação das doenças periodontais ocorrido em 1999 (ARMITAGE, 1999; LANG et al., 1999; ARMITAGE 2004) substituiu os termos periodontite juvenil localizada (PJJ), doença periodontal de acometimento precoce e doença periodontal de rápida progressão por um único termo denominado doença periodontal agressiva. Esta ainda pode ser classificada de acordo com a extensão da doença em localizada ou generalizada (ARMITAGE 1999; LANG et al., 1999). Esta infecção periodontal é vista como uma entidade clínica específica, com sinais clínicos distintos, que a diferem da periodontite crônica. Existe um forte consenso na literatura quanto ao envolvimento da espécie bacteriana *A. actinomycetemcomitans* na etiopatogenia da doença periodontal agressiva (SLOTS et al., 1980; ZAMBON et al., 1985; SCHENKEIN et al., 1993; TINOCO et al., 1997, CORTELLI et al., 2005). Porém, poucos estudos avaliaram de forma mais complexa a composição da microbiota subgengival de indivíduos com periodontite agressiva (ALBANDAR et al., 1997; CHRISTERSSON et al., 1985; CORTELLI et al, 2005). De modo geral, os estudos utilizaram a cultura microbiana ou PCR para determinação da microbiota associada à periodontite agressiva (ALBANDAR et al. 1997; TINOCO et al, 1997; GAJARDO et al, 2005; KAMMA et al., 1999, 2001, 2004, GAJARDO et al., 2005). O advento de novas técnicas microbiológicas e o avanço na identificação de novas espécies de microrganismos vem demonstrando que alguns indivíduos portadores de doença periodontal agressiva não apresentam ou apresentam baixas proporções de *A. actinomycetemcomitans* (HAN et al., 1991; KAMMA et al. 2001; MULLALLY et al.,

2000; LOPEZ et al., 1996; TREVILATTO et al., 2002; KAMMA et al., 2004). Esses dados sugerem que outras espécies bacterianas poderiam estar relacionadas ao início e progressão desta doença.

Sendo assim, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil microbiano subgengival por meio da técnica da Hibridação DNA-DNA e a diversidade bacteriana por análise clonal do gene *16S rRNA* em amostras de biofilme subgengival em uma população brasileira portadora de doença periodontal agressiva.

Primeiramente, é relevante a discussão do perfil clínico dos indivíduos selecionados. O grupo Saudável apresentou todos os parâmetros clínicos compatíveis com saúde periodontal, como valores significativamente inferiores dos parâmetros de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, sangramento à sondagem, sangramento gengival e supuração em relação ao grupo de indivíduos portadores de periodontite agressiva. O único parâmetro clínico que não diferiu significativamente entre os grupos foi o índice de placa visível. Embora uma das características da doença periodontal agressiva seja a baixa quantidade de biofilme supragengival, os indivíduos selecionados para este estudo apresentavam um índice de placa relativamente alto, em torno de  $53,30 \pm 14,8$ , enquanto o grupo Saudável apresentou média de  $43,7 \pm 17,8$  para este parâmetro. Valores semelhantes de índice de placa visível foram relatados na literatura entre indivíduos saudáveis (XIMENEZ-FLYVIE et al., 2000) e indivíduos portadores de doença periodontal agressiva (GAJARDO et al., 2005).

Em relação à extensão da doença, de acordo com as características clínicas observadas, pode-se sugerir que o grupo PA é formado por indivíduos que apresentam doença periodontal agressiva generalizada. Além de ter sido observada uma média elevada de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção ( $4,72 \pm 0,75$  e  $4,65 \pm 1,14$ , respectivamente), 59,3% dos sítios analisados apresentavam  $PS \geq 4$ mm, e 60% apresentavam  $NCI \geq 4$  mm. Perfis clínicos semelhantes de indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada foram relatados por outros autores (DARBY et al., 2000; KURU et al., 1999; MULLALLY et al., 2000; KAMMA et al., 2004; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006).

Muitos estudos microbiológicos envolvendo indivíduos com doença periodontal agressiva têm avaliado poucas espécies bacterianas (SLOTS et al., 1980; ZAMBON et al., 1985; SCHENKEIN et al., 1993; TINOCO et al., 1997; CORTELLI et al., 2005). No entanto, o biofilme subgengival é composto por diversas espécies de microrganismos altamente relacionadas entre si. As associações entre determinadas espécies, como a co-agregação, mediada por diferentes adesinas presentes nas superfícies celulares, e as relações de cooperação e antagonismo, e as diferentes fontes de nutrição irão caracterizar as propriedades do biofilme que será formado (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005; KOLEMBRANDER et al., 2006). Assim sendo, é de suma importância que o biofilme subgengival dos indivíduos com doença periodontal agressiva seja estudado de uma maneira mais complexa do que a análise de poucas espécies bacterianas, que representariam uma pequena porcentagem do total de células microbianas na amostra.

Os resultados obtidos neste estudo com a técnica de Hibridação DNA-DNA indicam que há diferenças quantitativas e qualitativas nos padrões de colonização das 38 espécies avaliadas entre os dois grupos clínicos estudados (Figuras 1 e 2). Foram observadas proporções médias significativamente mais altas de *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii*<sup>1</sup>, *S. sanguinis* e *C. ochraceae* em amostras de indivíduos saudáveis (S) comparadas às do grupo PA (Figura 1). Esses achados corroboram estudos anteriores que indicam que essas espécies estão associadas à saúde periodontal (COLOMBO et al., 2002; LOPEZ et al., 2004; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005; HAFFAJEE et al., 2006; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006).

Todas as espécies analisadas pelo método da Hibridação DNA-DNA foram detectadas em amostras de indivíduos saudáveis e de indivíduos portadores de doença periodontal agressiva. Entretanto, vários microrganismos periodontais foram encontrados em prevalências, níveis e proporções mais elevados nos indivíduos com doença periodontal agressiva do que nos saudáveis. Entre essas espécies, podem-se destacar algumas espécies do complexo laranja; *F. nucleatum ssp. polymorphum*, *P. intermedia*, *F. nucleatum ssp. nucleatum*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum ss. vincentii*, *E. nodatum*, *P. micros*, *C. rectus*; espécies do complexo vermelho, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* e outros microrganismos que não se agrupam em nenhum complexo, tais como, *S. noxia* e *P. melaninogenica*. Algumas destas espécies são consideradas patógenos periodontais verdadeiros ou possíveis patógenos (SLOTS et al., 1980; HOLT et al., 1991; SOCRANSKY et al., 1998; HAFFAJEE et al., 2006) e têm sido



relacionadas a diferentes formas de doenças periodontais (DZINK et al., 1988; HAFFAJEE et al., 1988; HAFFAJEE et al., 1997a; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006). Os achados do presente estudo estão de acordo com estudos microbiológicos anteriores que identificaram um grande número de patógenos periodontais em indivíduos com doença periodontal agressiva, dentre eles, espécies do complexo vermelho e laranja (LOESCHE et al. 1972; MOORE et al. 1982; KAMMA et al., 1995; KAMMA et al. 1999; MOORE et al., 2000; MULLALLY et al., 2000; MOMBELLI et al., 2002; KAMMA et al., 2004, XIMENEZ-FLYVIE et al., 2006).

As espécies bacterianas relacionadas com doença periodontal detectadas em maior frequência, proporção e nível no grupo com peridontite agressiva foram as espécies *T. forsythia* e *P. gingivalis* que pertencem ao complexo vermelho. Estes achados corroboram com outros estudos que encontraram uma alta prevalência destes patógenos em indivíduos com doença periodontal agressiva (DARBY et al., 2000; MULLALLY et al., 2000; KAMMA et al., 2004; XIMENEZ-FLYVIE et al., 2006). KAMMA et al. (2004) analisaram 66 indivíduos com doença periodontal agressiva por meio de cultura e observaram que a proporção de *T. forsythia* e de *P. gingivalis* na microbiota viável foi de 17,3% e 23,8%, respectivamente. As proporções encontradas no presente estudo para estes patógenos foram ligeiramente inferiores às relatadas por estes autores, sendo que a *T. forsythia* representava 14,1% da microbiota subgingival e *P. gingivalis* 17,4%. Sabe-se que os resultados de cultura referem-se ao total da microbiota viável e os resultados da Hibridação DNA-DNA refere-se apenas a proporção das 38 sondas

utilizadas. Além das diferenças entre metodologia entre os dois estudos (cultura, KAMMA et al., 2004 e Hibridação DNA-DNA, presente estudo), o fato de os indivíduos analisados no estudo de KAMMA et al. (2004) terem apresentado uma média de profundidade de sondagem superior a dos pacientes analisados em nosso estudo, poderia também explicar tais diferenças.

No presente estudo, outras espécies encontradas em prevalências e proporções mais elevadas nos indivíduos com doença periodontal agressiva do que nos indivíduos saudáveis foram *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Esses microrganismos representavam 5,3% e 6,4% das espécies avaliadas e estavam presentes, respectivamente, em 38,9% e 37,3% dos sítios avaliados em nível de contagem  $\geq 10^6$  células nos indivíduos com periodontite agressiva. Estes resultados estão de acordo com o estudo de ALBANDAR et al. (1997) que analisaram indivíduos com doença periodontal agressiva com idade variando entre 19 e 25 anos, por meio de sondas de DNA, e encontraram uma alta prevalência para estas espécies de *Prevotella*. KURU et al. (1999), MULLALLY et al. (2000) e KAMMA et al. (2004) também obtiveram resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, demonstrando altas prevalências e proporções destes patógenos no biofilme subgingival de indivíduos portadores de doença periodontal agressiva. Complementando, espécies de *Fusobacterium* também foram encontradas em prevalência e níveis de contagem elevados nas amostras subgingivais de indivíduos com doença periodontal agressiva em comparação aos indivíduos com saúde periodontal. Assim, esses resultados corroboram com estudos já realizados que detectaram uma alta prevalência de *F. nucleatum* em indivíduos com doença

periodontal agressiva (KURU et al., 1999; ALBANDAR et al., 1997; KAMMA et al., 2004; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006).

No presente estudo, *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em apenas 9% dos sítios em nível de contagem superior ou igual a  $10^6$  células/amostra nos indivíduos com doença periodontal agressiva. Por outro lado, utilizando como ponto de corte o nível de sensibilidade do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* ( $10^4$  células) foi possível notar que o percentual de sítios colonizados por *A. actinomycetemcomitans* foi de 70,3% para os indivíduos com periodontite agressiva (Anexo 5). Esse resultado está de acordo com outros estudos que observaram uma alta prevalência deste patógeno em indivíduos portadores de doença periodontal agressiva (ZAMBON 1985; SCHENKEIN et al., 1993; TINOCO et al., 1997; CORTELLI et al., 2005). Entretanto, apesar desta alta prevalência ao nível de  $10^4$  células, este periodontopatógeno foi detectado em baixas proporções e contagens nas amostras destes indivíduos. A proporção de *A. actinomycetemcomitans* detectada no presente estudo está de acordo com outros estudos (KAMMA et al., 2004; HAN et al., 1991; VAN DER VELDEN et al., 1989). KAMMA et al. (2004) detectaram 34 espécies bacterianas em amostras de biofilme subgengival de indivíduos com doença periodontal agressiva por meio de cultura microbiana e observaram que *A. actinomycetemcomitans* correspondia a cerca de 5,9% da microbiota viável. Estudos de cultura mostram que *A. actinomycetemcomitans* está presente em uma proporção em torno de 4-5% do total de espécies viáveis (RAMS et al., 1997; KAMMA et al., 2004). Os dados aqui apresentados revelaram uma proporção média de *A. actinomycetemcomitans* de

4,7% nas amostras de periodontite agressiva, em relação ao total de organismos analisados por sonda de DNA. As baixas proporções de *A. actinomycetemcomitans* levaram BRAGD et al. (1987) e RAMS et al. (1997) a sugerir que este microrganismo apresenta uma alta patogenicidade mesmo em baixas proporções no ambiente subgengival. Complementando, HAMLET et al. (2001) sugeriram que provavelmente *A. actinomycetemcomitans* seria um dos principais responsáveis pelo início da doença periodontal agressiva e posteriormente o aumento da profundidade de sondagem e a diminuição da taxa de oxigênio no ambiente subgengival permitiriam que espécies anaeróbias estritas, tais como *P. gingivalis*, se desenvolvessem. Pode-se observar por nossos resultados que *P. gingivalis* foi detectado em níveis, proporção e prevalência elevados nos sítios intermediários e profundos dos indivíduos com doença periodontal agressiva, maiores do que nas amostras de indivíduos com saúde periodontal (Figura 3). Estes resultados estão de acordo com estudos que associaram a presença do *P. gingivalis* à doença periodontal agressiva generalizada (TAKEUCHI et al., 2003; HAMLET et al., 2001; KAMMA et al., 2004; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006).

Apenas recentemente, a técnica da Hibridação DNA-DNA foi usada para analisar o perfil microbiológico de 19 indivíduos mexicanos com doença periodontal agressiva generalizada (XIMENEZ-FYVIE et al., 2006). Os resultados obtidos por estes autores foram semelhantes aos resultados do presente estudo, onde foram observados níveis, proporções e prevalência elevadas de espécies do

complexo laranja e do complexo vermelho no biofilme subgengival do grupo com doença periodontal agressiva quando comparados a indivíduos saudáveis.

Em relação às limitações deste estudo pode-se citar o número de indivíduos avaliados no grupo com doença periodontal agressiva. Apesar de vários estudos usarem um número pequeno de indivíduos com doença periodontal agressiva (ZAMBOM et al., 1983; LEE et al., 2003; XIMENEZ-FLYVIE et al., 2006), devido a especificidade da doença, o aumento deste número poderia aumentar a potência do estudo, realçar as diferenças já apontadas e, eventualmente, identificar outras diferenças importantes que não foram notadas. Outro ponto que deve ser considerado é que as sondas de DNA aqui empregadas não diferenciam clones virulentos de não-virulentos. Talvez o mais importante exemplo desta limitação seja o caso de *A. actinomycetemcomitans*. Embora *A. actinomycetemcomitans* seja considerado um patógeno na doença periodontal agressiva, sabe-se que clones altamente leucotóxicos estão associados com as formas mais agressivas da doença (HAUBEK et al., 2001). Desta maneira, apesar deste patógeno ter sido encontrado nos indivíduos com doença periodontal agressiva numa prevalência elevada, uma sonda que diferenciasses clones virulentos de clones não-virulentos seria útil em estudos futuros.

Considerando que a Hibridação DNA–DNA têm a capacidade de analisar somente os organismos homólogos às sondas empregadas, o presente estudo também analisou a diversidade bacteriana empregando a análise clonal por 16S *rRNA*. Esta última tem demonstrado, nos últimos anos, a grande diversidade de microrganismos presentes no ambiente subgengival e em outros nichos da

cavidade bucal (SAKAMOTO et al., 2000; PASTER et al., 2001; KAZOR et al., 2003; KUMAR et al., 2003; KUMAR et al., 2005).

No presente estudo foram analisadas amostras de 10 indivíduos com doença periodontal agressiva, sendo que as reações de amplificação do gene *16S rRNA*, clonagem em *E. coli* e posterior sequenciamento foram realizados em 12 amostras previamente selecionadas (ver item 3.5.2.1- Seleção dos sítios testes). Um mil e noventa e quatro clones foram analisados nos quais foram encontradas 156 espécies diferentes de bactérias (Anexo 4). A Figura 8 apresenta as 70 espécies mais prevalentes. A análise da literatura revelou que 40 destas 70 espécies (57%) ainda não foram cultivadas (Figura 8). Este resultado representa uma alta proporção de espécies ainda não cultivadas em comparação à média de 40% de espécies ainda não cultivadas encontrada em estudos de doença periodontal crônica (PASTER et al., 2001; PASTER et al., 2002; KUMMAR et al., 2005; AAS et al., 2005) ou de outras infecções orais (KAZOR et al., 2003; SAKAMOTO et al., 2006).

Foi possível observar que o gênero *Selenomonas*, seguido por espécies de *Streptococcus*, foram as espécies predominantes nos sítios com  $PS \geq 7$ mm. De um modo geral, 50% da biblioteca genômica observada foi constituída por estes dois gêneros (Figura 8). Foram encontradas 31 espécies diferentes de *Selenomonas*, sendo a espécie *Selenomonas sputigena* a mais prevalente, encontrada em 9 entre os 10 indivíduos. Este bacilo, multiflagelado, dotado de motilidade, anaeróbio estrito e Gram-negativo (mesmo pertencente ao filo *Firmicutes*; KOLENBRANDER et al., 1984) tem sido associado com casos de periodontite

ulcerativa necrozante (GMUR et al., 2004), periodontite de progressão rápida (KAMMA et al., 1994) e lesões periodontais ativas (HAFFAJEE et al., 1984; DZINK et al., 1988; TANNER et al., 1998). Outras espécies de *Selenomonas* encontradas em alta prevalência foram: *Selenomonas* sp. oral clone EW084/ EW076/ FT050/ strain GAA14/ P2PA\_80 e *Selenomonas noxia*. Estes resultados corroboram com outros estudos que encontraram alta prevalência destas espécies em infecções orais (PASTER et al., 2001; PASTER et al., 2002; KUMAR et al., 2005; de LILLO et al., 2006). Embora esta colonização predominante por diferentes espécies de *Selenomonas* não fosse esperada, alguns relatos descreveram um grande aumento de bactérias móveis em sítios ativos com doença periodontal (TANNER et al., 1998). Assim sendo, os resultados deste estudo corroboram com a hipótese de um papel relevante destas espécies na etiologia da doença periodontal agressiva.

Outras 3 espécies que vem sendo associadas com diferentes formas de doença periodontal e que foram encontradas em alta prevalência no presente estudo foram as espécies *Anaeroglobus geminatus* (*Megasphaera* sp. BB166), *Dialister invisus* e *Capnocytophaga granulosa*. Ambos, *Anaeroglobus geminatus* e *D. invisus*, têm sido detectados em grande número no ambiente subgengival de indivíduos com doença periodontal, mas não em indivíduos saudáveis (PASTER et al., 2001; KUMAR et al., 2003; KUMAR et al., 2005). Além disso, *C. granulosa* foi recentemente associada com doença periodontal crônica (CIANTAR et al., 2001; CIANTAR et al., 2005).

Em um estudo similar, HUTTER et al. (2003) analisaram 578 clones (sequências) provenientes de amostras do biofilme subgengival de 26 indivíduos com doença periodontal agressiva e observaram uma maior diversidade bacteriana do que a detectada no presente estudo. Os autores relataram à presença de espécies periodontopatogênicas tais como *P. gingivalis* e *Treponema socranskii*. No presente estudo, a diversidade bacteriana foi menor e os patógenos clássicos não foram encontrados pela clonagem *16S rRNA*. Estas diferenças nos resultados poderiam ser em virtude da população estudada, uma vez que HUTTER et al. (2003) selecionaram indivíduos com média de idade de 46 anos (variação de 22 a 73 anos), portanto superior a do presente estudo (média de 26 anos, variação de 20 a 29 anos), e os critérios para classificação de periodontite agressiva diferiram entre os estudos. Associado a este fator, os *primers* universais utilizados no presente estudo e no estudo de HUTTER et al. (2003) não foram iguais, o que pode ter contribuído para a diferença entre os resultados.

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 e entre diferentes sítios do mesmo indivíduo (Figura 8 e 9). Esta variação no perfil de colonização subgengival intra e inter-indivíduos foi recentemente descrita por TELES et al. (2006) usando a Hibridação DNA-DNA e por outros autores utilizando cultura e métodos moleculares (MOORE et al., 2000; KAMMA et al., 1995). TELES et al. (2006) sugeriram que diferentes indivíduos podem possuir perfis de colonização



microbiana diferenciados, indicando que diversos patógenos podem ser responsáveis pela etiologia da doença periodontal. Entretanto, existem grupos de espécies que podem ser agrupadas por meio de análise de *clusters* ou outras técnicas estatísticas, contudo, a análise de um grande número de amostras é necessária.

No presente estudo foram analisadas 12 amostras diferentes provenientes de 10 indivíduos com doença periodontal agressiva. Uma das amostras (amostra 4) foi analisada em duplicata, e os dados apresentados na tabela 5. Entre as 35 espécies detectadas nesta amostra, 14 foram detectadas em ambas amostras. Todas as espécies com prevalência maior que 5% foram detectadas em ambos ensaios, com exceção do clone *Selenomas genomosp* C2, que foi detectado em 13 clones, na reação 02. Estas diferenças poderiam possivelmente ser superadas se maior número de clones fossem seqüenciados a cada reação, ou que mais de um par de *primers* universais fossem utilizados. Entretanto, os procedimentos de clonagem e sequenciamento são financeiramente onerosos e demandam muito tempo de laboratório, o que torna impraticável a análise de um grande número de amostras.

Foram seqüenciados no presente estudo 86 clones por amostra em média. Este número é similar ao relatado por PASTER et al. (2001, 2002) e Aas et al. (2005). Porém, outros estudos como os descritos por SAKAMOTO et al. (2000, 2006), e o estudo com pacientes com periodontite agressiva de HUTTER et al (2003) analisaram um número muito menor de clones (variação de 15 a 25 por amostra). Portanto, a análise por *16S rRNA* é apenas descritiva, sinalizando a

presença de diferentes espécies em um determinado nicho, mas a real prevalência das diferentes espécies deveria ser confirmada por outros métodos, analisando maior número de sítios, em um grande número de pacientes.

Quando comparamos os resultados obtidos pela Hibridação DNA-DNA e os resultados da análise clonal da região do gene *16S rRNA* são observadas diferenças significativas entre os dois métodos microbiológicos. O delineamento experimental do presente estudo não teve como objetivo a comparação entre os métodos microbiológicos, entretanto algumas considerações podem ser feitas. Foram avaliadas pela Hibridação DNA-DNA 108 amostras de biofilme subgengival e pelo sequenciamento e clonagem do gene *16S rRNA* 12 amostras.

Podemos sugerir que nas amostras avaliadas, a proporção das espécies mais prevalentes encontradas pelo método da Hibridação DNA-DNA estavam abaixo do limite de detecção do método da análise clonal, ou seja < 2% da microbiota total (PASTER et al. 2001). Outros aspectos a serem considerados são os vieses que a própria técnica de amplificação pode induzir em amostras multigenômicas. De LILLO et al. (2006) utilizaram 3 *primers* universais para Bactérias e observaram que bibliotecas genômicas diferentes foram encontradas após a utilização do mesmo molde de DNA proveniente de amostra de biofilme subgengival. Além disso, o número de ciclos de amplificação também pode favorecer os vieses nos estudos de ecologia. BONNET et al. (2002) observaram que diferentes resultados foram encontrados variando o número de ciclos de amplificação de 10 até 25 ciclos. Resultados semelhantes haviam sido descritos anteriormente por SUZUKI e GIOVANNONI (1996). Além disso, métodos de

extração de DNA podem influenciar a biblioteca genômica formada (ZOETENDAL et al. 2001, SCUPHAM et al. 2007). Os mecanismos que causam estas diferentes bibliotecas genômicas a partir do mesmo molde de DNA não são conhecidos e necessitam de mais investigações. Outros aspectos podem ser considerados, tais como o risco de reação cruzada existente quando utilizamos sondas genômicas totais, como é o caso do método da Hibridação DNA-DNA aqui empregado. SOCRANSKY et al. (2004) relataram que o risco de reação cruzada deste método é inferior a 5% e que normalmente esta ocorreria entre espécies do mesmo gênero. Assim sendo, outros estudos são necessários para explicar a diferença nos resultados entre os métodos utilizados no presente estudo.

O maior ponto positivo deste estudo foi a utilização de duas técnicas moleculares para detecção microbiológica, tendo em vista que o biofilme subgengival é altamente complexo e que a interação entre as espécies irá determinar o papel patogênico desta massa bacteriana (SOCRANSKY e HAFFAJEE 2005; KOLENBRANDER et al., 2006). Assim, a Hibridação DNA- DNA permitiu a análise de 38 espécies bacterianas em um grande número de amostras em indivíduos com doença periodontal agressiva. Por outro lado, a análise clonal *16S rRNA* não requer a seleção prévia da microbiota a ser estudada, permitindo uma visualização possivelmente mais próxima a realidade da microbiota. A Hibridação DNA-DNA têm a capacidade de além de identificar a presença ou a ausência de microrganismos, também quantificar os níveis dessas espécies nas amostras analisadas. O teste possui uma sensibilidade de detecção de  $10^4$  células bacterianas. Este nível de detecção é satisfatório, principalmente

porque sabe-se que a principal diferença entre indivíduos saudáveis e indivíduos doentes está nos níveis das espécies no biofilme dental, e não na simples presença ou ausência destas no ambiente subgengival. Sendo assim, diversos autores têm considerado no cálculo de prevalência, os sítios colonizados apenas aqueles com contagens bacterianas superiores a  $10^4$  ou  $10^5$  células (SOCRANSKY e HAFAJEE et al. 2005; HAFAJEE et al., 2006).

Assim sendo, pode-se observar nas Figuras 1 e 3, uma alta prevalência de bactérias periodontopatogênicas, tais como espécies do complexo vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*) e laranja (*F. nucleatum ssp. nucleatum*, *F. nucleatum ssp. polymorphum*, *F. nucleatum ssp. vincentii*, *E. nodatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*), por meio das sondas de DNA. Enquanto que a análise da diversidade obtida pela clonagem e sequenciamento do gene *16S rRNA* revelou a predominância de diferentes espécies de *Selenomonas* e *Streptococcus sp.* (Figura 8).

Assim sendo, estes dados sugerem a necessidade de maiores estudos que revelem a real associação dos microrganismos detectados por análise clonal de *16SrRNA* com o início e progressão da doença periodontal agressiva. Além disso, estudos que revelem os fatores de virulência e a resposta do hospedeiro a estes organismos, muitos ainda não cultiváveis são relevantes para o entendimento da etiologia da doença. Por último, estudos longitudinais que revelem as mudanças na microbiota como um todo associadas ao sucesso e ao insucesso da terapia periodontal suportariam a inclusão de certas espécies no grupo dos organismos considerados periodontopatógenos.

## 6 CONCLUSÃO

Baseados na metodologia empregada podem concluir que:

Os perfis de colonização microbiana determinados por Hibridação DNA-DNA de indivíduos brasileiros com doença periodontal agressiva e periodontalmente saudáveis são distintos, sendo que:

- o grupo com periodontite agressiva apresentou freqüência, níveis e proporções mais elevados de espécies relacionadas à periodontite, principalmente do complexo vermelho, e mais baixos de microrganismos benéficos do que o grupo de indivíduos com saúde periodontal.

- *A. actinomycetemcomitans* apresentou-se em níveis, proporção e prevalência mais elevados nas amostras dos indivíduos com periodontite agressiva, sugerindo a sua associação com a doença. No entanto, *A. actinomycetemcomitans* estava presente em baixas proporções, não apresentando correlação com os parâmetros clínicos da doença periodontal analisados.

- Houve uma correlação entre a profundidade de sondagem e a proporção das espécies do complexo vermelho nos indivíduos com periodontite agressiva, sugerindo a sua participação na doença.

A microbiota subgengival determinada por Análise clonal de *16S rRNA* de amostras de indivíduos brasileiros com doença periodontal agressiva é constituída por:

- microrganismos não cultiváveis em cerca de 57%.

- Espécies de *Selenomonas*, principalmente *S. sputigena*, em alta proporção.
- Por espécies dos gêneros *Streptococcus* e *Selenomonas* em cerca de 50%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, J.A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.11, p.5721-5732, 2005.

ALBANDAR, J.M.; BROWN, L.J.; LOE, H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, v.68, n.6, p.973-981, 1997.

ALI, R.W.; LIE, T.; SKAUG, N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. **J. Periodontol.**, v.63, n.6, p.540-547, 1992.

AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v.25, n.4, p.229-235, 1975.

ARAUJO, M.W.; HOVEY, K.M.; BENEDEK, J.R.; GROSSI, S.G.; DORN, J.; WACTAWSKI-WENDE, J.; GENCO, R.J.; TREVISAN, M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. **J. Periodontol.**, v. 74, n.12, p.1736-1740, 2003.

ARMITAGE, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann. Periodontol.**, v.4, p.1-6, 1999.

ARMITAGE, G.C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontol. 2000.**, v.34, p. 9-21, 2004.

BELTRAMI, M.; BICKEL, M.; BAEHNI, P.C. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microflora in human periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.14, n.3, p.161-164, 1987.

BONNET, R.; SUAU, A.; DORE, J.; GIBSON, G.R.; COLLINS, M.D. Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.52, n.3, p.757-763, 2002.

BRAGD, L.; DAHLEN, G.; WIKSTROM, M.; SLOTS, J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. **J. Clin. Periodontol.**, v.14, n.2, p.95-99, 1987.

CHRISTERSSON, L.A.; SLOTS, J.; ZAMBON, J.J.; GENCO, R.J. Transmission and colonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. **J. Periodontol.**, v.53, n.6, p. 127-131, 1985.

CIANTAR, M.; SPRATT, D.A.; NEWMAN, H.N.; WILSON, M. *Capnocytophaga granulosa* and *Capnocytophaga haemolytica*: novel species in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v.28, n.7, p.701-705, 2001..

CIANTAR, M.; GILTHORPE, M.S.; HUREL, S.J.; NEWMAN, H.N.; WILSON, M.; SPRATT, D.A. *Capnocytophaga* spp. in periodontitis patients manifesting diabetes mellitus. **J. Periodontol.**, v.76, n.2, p.194-203, 2005.

COLOMBO, A.P.; TELES, R.P.; TORRES, M.C.; SOUTO, R.; ROSALEM, W.J.; MENDES, M.C.; UZEDA, M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v.73, n.4, 360-369, 2002.

CORTELLI, J.R.; CORTELLI, S.C.; JORDAN, S.; HARASZTHY, V.I.; ZAMBON, J.J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.32, n.8, p.860-866, 2005.

CORTELLI, S.C.; JORGE, A.O.; CORTELLI, J.R.; JORDAN, S.F.; HARASZTHY, V.I. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.7, n.2, 183-188, 2003.

CUGINI, M.A.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, C.; KENT JR., R.L.; SOCRANSKY, S.S. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal disease: 12-month results. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, n.1, p.30-36, 2000.

DAHAN, M.; TIMMERMAN, M.F.; VAN WINKELHOFF, A.J.; VAN DER VELDEN, U. The effect of periodontal treatment on the salivary bacterial load and early plaque formation. **J. Clin. Periodontol.**, v.31, n.11, p.972-977, 2004.

DARBY, I.B.; HODGE, P.J.; RIGGIO, M.P.; KINANE, D.F. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, n.6, p.417-24, 2000.

DE LILLO, A.; ASHLEY, F.P.; PALMER, R.M.; MUNSON, M.A.; KYRIACOU, L.; WEIGHTMAN, A.J.; WADE, W.G. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v.21, n.1, p.61-68, 2006.

DEWHIRST, F.E.; TAMER, M.A.; ERICSON, R.E.; LAU, C.N.; LEVANOS, V.A.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L.; PASTER, B.J. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v.15, n.3, p.196-200, 2000.



DZINK, J.L.; SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v.15, n.5, p.316-323, 1988.

FAVERI, M.; FERES, M.; SHIBLI, J.A.; HAYACIBARA, R.F.; HAYACIBARA, M.M.; DE FIGUEIREDO, L.C. Microbiota of the Dorsum of the Tongue After Plaque Accumulation: An Experimental Study in Humans. **J. Periodontol.** v.77, n.9, p.1539-1546, 2006.

FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal Biochem.**, v.132, n.1, p.6-13, 1983

FERES, M.; HAFFAJEE, A.D.; GONÇALVES, C.; ALLARD, K.; SOM, S.; SMITH, C.; GOODSON, M.; SOCRANSKY, S.S. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. **J. Clin. Periodontol.**, v.26, n.12, p.775-783, 1999.

FERES, M.; HAFFAJEE, A.D.; ALLARD, K.; SOM, S.; SOCRANSKY, S.S. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. **J. Clin. Periodontol.**, v.28, n.7, p. 597-609, 2001.

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.**, v.23, n.8, p. 795-802, 1996.

GAJARDO, M.; SILVA, N.; GOMEZ, L.; LEON, R.; PARRA, B.; CONTRERAS, A., GAMONAL, J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. **J. Periodontol.**, v.76, n.2, p.289-294, 2005.

GMUR, 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.**, v.112, n.1, p.33-41, 2004.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; EBERSOLE, J.L.; SMITH, D.J. Clinical, microbiological and immunological features associated with the treatment of active periodontosis lesions. **J. Clin. Periodontol.**, v.11, n.9, p.600-618, 1984.

HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; DIBART, S.; SMITH, C.; KENT, R.L. JR; SOCRANSKY, S.S. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. **J. Clin. Periodontol.**, v.12, n.10, p.767-776, 1997(a).

HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; DIBART, S.; SMITH, C.; KENT, R.L. JR; SOCRANSKY, S.S. The effect of SRP on the clinical and microbiological

parameters of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v.24, n.10, p.324-334, 1997(b).

HAFFAJEE, A.D.; TELES, R.P.; SOCRANSKY, S.S. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. **Periodontol.** 2000., v.42, p.219-258, 2006.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; DZINK, J.L.; TAUBMAN, M.A.; EBERSOLE, J.L.; SMITH, D.J. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v.15, n.4, p.240-246, 1988.

HAFFAJEE, A.D.; TELES, R.P.; SOCRANSKY, S.S. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v.21, n.5., p.269-282, 2006.

HAMLET, S.M.; CULLINAN, M.P.; WESTERMAN, B. et al. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population. **J. Clin. Periodontol.**, v.28, n.12, p.1163-1171, 2001.

HAN, N.M.; XIAO, X.R.; ZHANG, L.S.; RI, X.Q.; ZHANG, J.Z.; TONG, Y.H.; YANG, M.R.; XIAO, Z.R. Bacteriological study of juvenile periodontitis in China. **J. Periodont. Res.**, v.26, n.5, 409-414, 1991.

HAUBEK, D.; ENNIBI, O.K.; POULSEN, K.; POULSEN, S.; BENZARTI, N.; KILIAN, M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Dent. Res.**, v.80, n.6, p.1580-1583, 2001.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends. Biotechnol.**, v.14, n.6, p.190-197, 1996.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J. Bacteriol.**, v.180, n.24, p.4765-4774, 1998.

HUTTER, G.; SCHLAGENHAUF, U.; VALENZA, G.; HORN, M.; BURGEMEISTER, S.; CLAUS, H.; VOGEL, U. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. **Microbiology.**, v.149, n. 1, p.67-75, 2003.

HOLT, S.C.; BRAMANTI, T.E. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, v.2, n.2, p.177-281, 1991.

ISHIKAWA, I.; KAWASHIMA, Y.; ODA, S.; IWATA, T.; ARAKAWA, S. Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. **J. Periodontol. Res.**, v.37, n.5, p.324-332, 2002.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. N. Munro (ed.), Mammalian protein metabolism, vol. 3. **Academic Press, Inc.**, New York, N.Y. 1969.

KAMMA, J.J.; NAKOU, M.; MANTI, F.A. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. **J Periodontol.**, v.65, n.11, p. 1073-1078, 1994.

KAMMA, J.J.; NAKOU, M.; PERSSON, R.G. Association of early onset periodontitis microbiota with aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid. **J. Clin. Periodontol.**, v.28, n.12, p.1096-1105, 2001.

KAMMA, J.J.; NAKOU, M.; GMUR, R.; BAEHNI, P.C. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v.19, n.5, p.314-21, 2004.

KAMMA, J.J.; NAKOU, M.; MANTI, F.A. Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. **J. Periodontol. Res.**, v.30, n.1, p.66-72, 1995.

KAMMA, J.J.; NAKOU, M.; BAEHNI, P.C. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. **J. Periodontol. Res.**, v.34, n.1, p.25-33, 1999.

KAZOR, C.E.; MITCHELL, A.M.; LEE, A.M.; STOKES, L.N.; LOESCHE, W.J.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.2, p.558-563, 2003.

KOLENBRANDER, P.E.; PALMER, R.J. JR.; RICKARD, A.H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N.I.; DIAZ, P.I. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontol. 2000.**, v.42, p.47-79, 2006.

KOLENBRANDER, P.E.; ANDERSEN, R.N.; MOORE, L.V. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. **Infect. Immun.**, v.57, n.10, p.3194-203, 1989.

KUMAR, P.S.; GRIFFEN, A.L.; MOESCHBERGER, M.L.; LEYS, E.J. Identification of Candidate Periodontal Pathogens and Beneficial Species by Quantitative 16S Clonal Analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.8, p.3944-3955, 2005.

KUMAR, P.S.; GRIFFEN, A.L.; BARTON, J.A.; PASTER, B.J.; MOESCHBERGER, M.L.; LEYS, E.J. New bacterial species associated with chronic periodontitis. **J. Dent. Res.**, v.82, n.5, p.338-344, 2003.

KURU, B.; YILMAZ, S.; NOYAN, U.; ACAR, O.; KADIR, T. Microbiological features and crevicular fluid aspartate aminotransferase enzyme activity in early onset periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, v.26, n.1, p.19-25, 1999.

LANG, N.K.; BARTOLD, P.M.; CULLIAN, M.; JEFFCOAT, M.; MOMBELLI, A.; PAGE, R.; PAPAPANOU, P.; TONETTI, M.; VAN DYKE, T. Consensus reports: aggressive periodontitis. **Ann. Periodontol.**, v.4, n. 1, p.53, 1999.

LEE, J.W.; CHOI, B.K.; YOO, Y.J.; CHOI, S.H.; CHO, K.S.; CHAI, J.K.; KIM, C.K. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, v.74, n.9, p.1329-1335, 2003.

LOPEZ, N.J.; SOCRANSKY, S.S.; DA SILVA, I.; JAPLIT, M.R.; HAFFAJEE, A.D. Subgingival microbiota of chilean patients with chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v.75, n.5, p.717-725, 2004.

LOPEZ, N.J.; MELLADO, J.C.; LEIGHTON, G.X. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.23, n.2, p.101-105, 1996.

LIE, M.A.; DANSER, M.M.; VAN DER; WEIJDEN, G.A.; TIMMERMAN, M.F.; DE GRAAF, J.; VAN DER VELDEN, U. Oral microbiota in subjects with a weak or strong response in experimental gingivitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.22, n.5, p.642-647, 1995.

LOESCHE, W.J.; HOCKETT; R.N.; SYED, S.A. The predominant cultivable flora of tooth surface plaque removed from institutionalized subjects. **Arch. Oral. Biol.**, v.17, n.9, p.1311-1325, 1972.

LOESCHE, W.J., SYED, S.A., SCHMIDT, E., MORRISON, E.C. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. **J. Periodontol.**, v.56, n.8, p. 447-456, 1985.

MANDELL, R.L.; SOCRANSKY, S.S. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. **J. Periodontol.**, v.52, n.10, p.593-598, 1981.

MOMBELLI, A.; CASAGNI, F.; MADIANOS, P.N. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. **J. Clin. Periodontol.**, v.29, n.3, p.10-21, 2002.

MOORE, W.E.C.; MOORE, L.V.H. The bacterial of periodontal disease. In microbiology and Immunology of periodontal disease. **Periodontol.** 2000, v.5, p.66-77, 2000.

MOORE, W.E.; HOLDEMAN, L.V.; SMIBERT, R.M.; HASH, D.E.; BURMEISTER, J.A.; RANNEY, R.R. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. **Infect. Immun.**, v.38, n.3, p.1137-1148, 1982.

MULLALLY, B.H.; DACE, B.; SHELBURNE, C.E.; WOLF, L.F.; COULTER, W.A. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early onset periodontitis. **J. Periodontol. Res.**, v.35, n.4, p. 232-241, 2000.

NEWMAN, M.G.; SOCRANSKY, S.S. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. **J. Periodontol. Res.**, v.12, n.2, p.120-128, 1977.

NORSKOV-LAURITSEN, N., KILIAN, M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, n.9, p. 2135-2146, 2006.

OLSEN, G.J.; LANE, D.J.; GIOVANNONI, S.J.; PACE, N.R. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.40, p.337-365, 1986.

OMAR, A.A.; NEWMAN, H.N.; BULMAN, J.; OSBORN, J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. **J. Clin. Periodontol.**, v.17, n.6, p.364-370, 1990.

PASTER, B.J.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L.; ERICSON, R.E.; LAU, C.N.; LEVANOS, V.A.; SAHASRABUDHE, A.; DEWHIRST, F.E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J. Bacteriol.**, v.183, n.12, p.3770-3783, 2001.

PASTER, B. J.; F. E. DEWHIRST. Phylogeny of campylobacters, wolinellas, *Bacteroides gracilis*, and *Bacteroides ureolyticus* by 16S rRNA sequencing. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 38, p. 56-62, 1988.

PASTER, B.J.; OLSEN, I.; AAS, J.A.; DEWHIRST, F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontol.** 2000., v.42, p.80-87, 2006.

PASTER, B.J.; RUSSELL, M.K.; ALPAGOT, T.; LEE, A.M.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L.; DEWHIRST, F.E. Bacterial diversity in necrotizing ulcerative periodontitis in HIV-positive subjects. **Ann. Periodontol.**, v.7, p.8-16, 2002.

RAMS, T.E.; LISTGARTEN, M.A.; SLOTS, J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. **J. Clin. Periodontol.**, v.23, n.4, p.346-354, 1997.

RUSSO, P.A.; NOWZARI, H.; SLOTS, J. Transmission and persistence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in twins with advanced periodontitis. **J. Calif. Dent. Assoc.**, v.26, n.4, p.290-294, 1998.

SAKAMOTO, M.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I.; BENNO, Y. Comparison of the oral bacterial flora in saliva from a healthy subject and two periodontitis patients by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **Microbiol. Immunol.**, v.44, n.8, p.643-652, 2000.

SAKAMOTO, M.; ROCAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. JR.; BENNO, Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v.21, n.2, p.112-122, 2006.

SCHENKEIN, H.A.; BURMEISTER, J.A.; KOERTGE, T.E.; BROOKS, C.N.; BEST, A.M.; MOORE, L.V.; MOORE, W.E. The influence of race and gender on periodontal flora. **J. Periodontol.**, v.64, n.4, p.292-296, 1993.

SCUPHAM, A.J.; JONES, J.A.; WESLEY, I.V. Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. **J. Appl. Microbiol.**, v.102, n.2, p.401-409, 2007.

SLOTS, J.; REYNOLDS, H.S.; GENCO, R.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. **Infect. Immun.**, v.29, n.3, p.1013-1020, 1980.

SMITH, G.L.F.; SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.M. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v.4, n.1, p.47-51, 1989.

SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; MARTIN, L.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; LEVIN, A.E. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. **Biotechniques.**, v.17, n.4, p.788-792, 1994.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol. 2000.**, v.38, p.135-187, 2005.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, C.; DIBART, S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. **J. Clin. Periodontol.**, v.18, n.10, p.766-775, 1991.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, AD, CUGINI MA, SMITH C, KENT RL JR. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, p.134-144, 1998.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, C.; MARTIN, L.; HAFFAJEE, J.A.; UZEL, N.G.; GOODSON, J.M. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v.19, n.6, p.352-362, 2004.

SUZUKI, M.T.; GIOVANNONI, S.J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Appl Environ Microbiol.**, V.62, n.2, p.625-630,1996.

TAKEUCHI, Y.; UMEDA, M.; ISHIZURA, M.; HUANG, Y.; ISHIKAWA, I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japonise population. **J. Periodontol.**, v.74, n.10, p.1060-1069, 2003.

TANNER, A.; MAIDEN, M.F.; MACUCH, P.J.; MURRAY, L.L.; KENT, R.L. JR. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, n.2, p.85-98, 1998.

TELES, R.P.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbiological goals of periodontal therapy. **Periodontol 2000.**, v.42, p.180-218, 2006.

TINOCO, E.M.; BELDI, M.I.; LOUREIRO, C.A.; LANA, M.; CAMPEDELLI, F. TINOCO, N.M.; GJERMO, P.; PREUS, H.R. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. **Eur. J. Oral. Sci.**, v.105, n.1, p.9-14, 1997.

TONETTI, M.S.; MOBELI, A. Early-onset periodontitis. **Ann. Periodontol.**, v.4, n.1, p.39-53, 1999.

TREVILATTO, P.C.; TRAMONTINA, V.A.; MACHADO, M.A.; GONCALVES, R.B.; SALLUM, A.W.; LINE, S.R. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.29, n.3, p.233-239, 2002.

VAN DER VELDEN, U.; ABBAS, F.; VAN STEENBERGEN, T.J.; DE ZOETE, O.J.; HESSE, M.; DE RUYTER, C.; DE LAAT, V.H.; DE GRAAFF, J. Prevalence of periodontal breakdown in adolescents and presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subjects with attachment loss. **J. Periodontol.**, v.60, n.8, p.604-610, 1989.

XIMENEZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, n.3, p.648-657, 2000.

XIMENEZ-FYVIE, L.A.; ALMAGUER-FLORES, A.; JACOBO-SOTO, V.; LARA-CORDOBA, M.; MORENO-BORJAS, J.Y.; ALCANTARA-MARURI, E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.33, n.12, p. 869-877, 2006.

YANG, H.W.; HUANG, Y.F.; CHAN, Y.; CHOU, M.Y. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. **Eur. J. Oral. Sci.**, v.113, n.1, p.28-33, 2005.

ZAMBON, J.J.; CHRISTERSSON, L.A.; SLOTS, J.. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. **J. Periodontol.**, v.54, n.12, p.707-11, 1983.

ZAMBON, J.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v.12, n.1, p1-20, 1985.

ZOETENDAL, E.G.; BEN-AMOR, K.; AKKERMANS, A.D.; ABEE, T.; DE VOS, W.M. DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.24, n.3, p.405-410, 2001.



## ANEXO 1

Universidade de São Paulo  
Instituto de Ciências Biomédicas

C.E.P.S.H. - ICBUSP  
Recebido em: 03/02/06  
Ass: \_\_\_\_\_

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE

#### **ESTUDO: Identificação de possíveis organismos associados à periodontite agressiva por análise clonal de 16SrRNA**

*Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.*

Eu, ( inserir o nome, profissão, residente e domiciliado na ....., portador da Cédula de identidade, RG ....., e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "Identificação de possíveis organismos associados à periodontite agressiva por análise clonal de 16SrRNA". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada "Doença periodontal agressiva" que pretende estudar o perfil de bactérias presentes na doença periodontal agressiva e identificar novas bactérias (germes) que possam estar associadas a doença. A doença periodontal agressiva é uma inflamação das gengivas e pode levar até à perda dos dentes;
- II) Serão feitas coletas de placa dentária (sujeira dos dentes) presente em três diferentes dentes, sendo realizadas no mesmo dia;
- III) Essa coleta serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciará o tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo momento da coleta (introdução da cureta entre o espaço existente entre o dente e a gengiva);
- IV) Todos os voluntários receberão o tratamento periodontal gratuitamente. O tratamento utilizado será de raspagem das superfícies dos dentes: coroa e raiz e o uso da associação de antibióticos (Amoxicilina 500 mg 3x/dia durante 14 dias e Metronidazole 400mg 3x/dia durante 14 dias) utilizados no tratamento das doenças periodontais agressivas que irá ajudar na eliminação dos microrganismos (germes)

presentes na placa dentária causadora da doença nas gengivas. Todos esses procedimentos são simples e não apresentam riscos para o paciente.

- V) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- VI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento odontológico;
- VII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VIII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

São Paulo, de de 2001

Paciente /  Responsável .....

**Testemunha 1 :** \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

**Testemunha 2 :** \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

**Responsável pelo Projeto:** \_\_\_\_\_  
Dr. Marcelo de Faveri, Periodontista, CRO-PR: 15.431

Dúvidas: Marcelo de Faveri  
Rua Piracema, n 71 apto 71, Santa Terezinha, São Paulo  
Tel: 8456-4521

Dúvidas e reclamações  
Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP -Fone 3091.7733

## ANEXO 2

### CLINICA ODONTOLÓGICA

**Informações Gerais:**

Paciente \_\_\_\_\_ nº do Prontuário \_\_\_\_\_  
 R.G. \_\_\_\_\_ Sexo:  Masc  Fem Nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Local de Residência:  Zona Urbana   
 Naturalidade (estado de nascimento) \_\_\_\_\_ Estado Civil:  Solteiro  Casado civil  Casado   
 Profissão \_\_\_\_\_ Cor:  Branca  Preta  Pardo  Indígena  Amarelo   
 Local de Trabalho:  Zona Urbana  Zona Rural  Não trabalha Endereço (res.) \_\_\_\_\_  
 Bairro \_\_\_\_\_ Cidade (estado): \_\_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_ Fone \_\_\_\_\_  
 Educação:  Analfabeto  1º Grau  Incompleto  Completo  2º Grau  Incompleto  Completo  3º Grau  Incompleto  Completo  Po  
 Emprego atual:  Formal (carteira)  Informal  Autônomo  Desempregado  Aposentado  Estudante  Dona de casa  
 Renda Familiar:  até 1 salário mínimo  2 a 5 salários mínimos  6 a 10 salários mínimos  > 10 salários mínimos  Sem  
 Aluno \_\_\_\_\_ Nº \_\_\_\_\_  
 Professor Responsável \_\_\_\_\_

**Queixa principal (motivo pelo qual procurou tratamento):**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Estado de Saúde Geral:**

Marque com um "X" no quadrado a esquerda, se a resposta for afirmativa. Comentários poderão ser feitos nos espaços em branco

**ATUALIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES MÉDICAS**

- Esta atualmente em tratamento médico? \_\_\_\_\_
- Há quanto tempo fez a última avaliação médica? \_\_\_\_\_
- Esta tomando algum medicamento no momento? Qual? Quanto tempo? \_\_\_\_\_

- |  |   |  |
|--|---|--|
| <input type="checkbox"/> Já sofreu ou sofre de                                   | <input type="checkbox"/> Sopro no coração.      | <input type="checkbox"/> Ataque cardíaco       |
| <input type="checkbox"/> Pressão alta  | <input type="checkbox"/> Derrame.               | <input type="checkbox"/> Dificuldade respirar. |
| <input type="checkbox"/> Palpitação  | <input type="checkbox"/> Dor no peito.          | <input type="checkbox"/> Febre reumática.      |
| <input type="checkbox"/> Colesterol alto   | <input type="checkbox"/> Convulsões.            | <input type="checkbox"/> Desmaios.             |
| <input type="checkbox"/> Hérnia  | <input type="checkbox"/> Gastrite               | <input type="checkbox"/> Úlcera.               |
| <input type="checkbox"/> Alteração coagulação                                    | <input type="checkbox"/> Hemofilia              | <input type="checkbox"/> Bocio.                |
| <input type="checkbox"/> Ganho de peso   | <input type="checkbox"/> Emagrecimento.         | <input type="checkbox"/> Alteração tireoide    |
| <input type="checkbox"/> Ansiedade   | <input type="checkbox"/> Insônia                | <input type="checkbox"/> Xerostomia            |
| <input type="checkbox"/> Menopausa   | <input type="checkbox"/> Osteoporose            | <input type="checkbox"/> Abscesso.             |
| <input type="checkbox"/> Problemas renais  | <input type="checkbox"/> Diabetes.              | <input type="checkbox"/> Infecções repetidas   |
| <input type="checkbox"/> Herpes  | <input type="checkbox"/> Candidose.             | <input type="checkbox"/> <u>Tuberculose</u>    |
| <input type="checkbox"/> <u>Sífilis</u>  | <input type="checkbox"/> <u>Sarampo</u> .       | <input type="checkbox"/> <u>Febre amarela</u>  |
| <input type="checkbox"/> <u>Maneja</u>   | <input type="checkbox"/> <u>Denque</u> .        | <input type="checkbox"/> <u>Colera</u>         |
| <input type="checkbox"/> <u>Malária</u>  | <input type="checkbox"/> <u>Doença Chagas</u> . | <input type="checkbox"/> <u>Toxoplasmose</u>   |
| <input type="checkbox"/> <u>Hepatite</u>   | <input type="checkbox"/> <u>Hanseníase</u> .    | <input type="checkbox"/> <u>Catapora</u> .     |
| <input type="checkbox"/> Asma  | <input type="checkbox"/> Bronquite              | <input type="checkbox"/> Pneumonia.            |
| <input type="checkbox"/> Intercia  | <input type="checkbox"/> Problemas hepáticos.   | <input type="checkbox"/> Vermídeos.            |
| <input type="checkbox"/> Tumores.  | <input type="checkbox"/> Apêndice.              | <input type="checkbox"/> Sinusite.             |
| <input type="checkbox"/> Foi hospitalizado                                       | <input type="checkbox"/> Dependência química    |  |
| <input type="checkbox"/> Passou por alguma transfusão de sangue? _____           |   |  |
| <input type="checkbox"/> Passou por tratamentos de radio ou quimioterapia? _____ |   |  |
| <input type="checkbox"/> Teve reações indesejáveis a algum medicamento? _____    |   |  |

- Tem ou teve qualquer tipo de alergia? Qual (is)? \_\_\_\_\_
- O(s) pai(s) ou algum de sua família é diabético? \_\_\_\_\_
- Já esteve exposto ao vírus da AIDS? \_\_\_\_\_
- Já esteve exposto a DST? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_
- Sente dor de cabeça com frequência? \_\_\_\_\_
- Tem ou teve articulações doloridas ou inchadas? \_\_\_\_\_

**ATUALIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES ODONTOLÓGICAS**

- Teve alguma complicação em tratamento odontológico? \_\_\_\_\_
- Tem algum receio em relação ao tratamento odontológico? \_\_\_\_\_
- Considera-se uma pessoa ansiosa ou nervosa? \_\_\_\_\_
- Sua articulação doi ou estala quando mastiga? \_\_\_\_\_
- Tem o hábito de ranger ou apertar aos dentes? \_\_\_\_\_
- Suas gengivas sangram com facilidade? \_\_\_\_\_
- Toma regularmente bebidas alcoólicas?  destilados  fermentados
- É fumante?  sim  não há \_\_\_\_ anos \_\_\_\_ cigarros/dia
- tipos de fumo \_\_\_\_\_
- Para as mulheres você está grávida? \_\_\_\_\_

- Teve instruções para uma correta higiene oral? \_\_\_\_\_

**HIGIENE DENTÁRIA:**

- Higiene  Boa  Satisfatória  Insatisfatória
- Frequência de escovação  1 X  2 X  3 X
- Uso do fio dental  Diária  De vez em quando  Nunca
- Predisposição  cárie  doença periodontal
- Utiliza outros meios auxiliares de higiene.  Sim  Não
- Quais? \_\_\_\_\_

**Motivação do paciente**

**ANOTAÇÕES IMPORTANTES:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

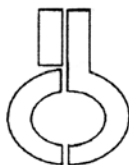
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Receita do paciente: \_\_\_\_\_  
 Declaro que entendo as condições de uso e uso esta ficha de acordo com a verdade.

## ANEXO 3



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: cep@icb.usp.br

---

São Paulo, 02 de fevereiro de 2006.

### PARECER 685/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 62ª reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Identificação de possíveis organismos associados à periodontite agressiva por análise clonal de 16SrRNA*".

**Informo que, após análise e discussão, o referido projeto, foi aprovado por esta Comissão.**

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.  
MARCELO DE FAVERI  
Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

## ANEXO 4

Frequências e a proporção da relação de todas as espécies identificadas a partir do gene 16S rRNA

Espécies	AMOSTRAS												
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
<i>Actinomyces gerencseriae</i>					2(2,4)								
<i>Atopobium parvulum</i>					1(1,2)								
<i>Atopobium rimae</i>					2(2,4)								
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>							3(4,1)	3(4,1)	8(8,7)				
<i>Capnocytophaga granulosa</i>									17(18)		5(7,0)		
<i>Catonella</i> sp. AH153					1(1,2)								
<i>Catonella</i> sp. EZ006			1(1,2)									2(2,6)	
<i>Clostridium</i> sp. UQ083	1(1,2)												
<i>Clostridium</i> sp. UW009			1(1,2)										
<i>Desulfobullus</i> sp. CH031			1(1,2)										
<i>Dialister invisus</i>					6(7,1)								5(5,7)
<i>Dialister pneumosintes</i>					1(1,2)								
<i>Dialister</i> sp. 55A-29				2(2,2)									
<i>Dialister</i> sp. BS095				2(2,2)		1(1,1)	3(3,1)	1(1,4)		8(10)			1(1,1)
<i>Dialister</i> sp. GB027													2(2,2)
<i>Eubacterium brachy</i>			1(1,2)								1(1,4)	2(2,6)	
<i>Eubacterium tardum</i>												5(6,5)	
<i>Eubacterium</i> sp. CK047								1(1,4)					
<i>Eubacterium infirmum</i>		6(6,9)		1(1,1)	3(3,5)		2(2,1)						
<i>Eubacterium saburreum</i>	4(4,8)							1(1,4)		1(1,3)			2(2,2)
<i>Eubacterium nodatum</i>												1(1,3)	
<i>Eubacterium saphenum</i>												27(35)	
<i>Eubacterium</i> sp. BP2-88													2(2,2)
<i>Eubacterium</i> sp. BU014					1(1,2)								
<i>Eubacterium</i> sp. DO008											4(5,6)		
<i>Eubacterium</i> sp. DO008						1(1,1)							
<i>Eubacterium</i> sp. DO016				1(1,1)									1(1,1)
<i>Eubacterium</i> sp. IR009				1(1,1)		4(4,3)			2(2,2)		3(4,2)		1(1,1)
<i>Eubacterium</i> sp. JM048	2(2,4)												
<i>Eubacterium</i> sp. JN088				3(3,3)									
<i>Eubacterium</i> sp. PUS9.170			1(1,2)									4(5,2)	
<i>Eubacterium</i> sp. JS001												1(1,3)	
<i>ubacterium yurii</i>			3(3,7)						1(1,1)			1(1,3)	

Espécie	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
<i>Filifactor alocis</i>			4(4,9)	1(1,1)		2(2,2)				2(2,6)		3(3,9)	
<i>Firmicutes</i> sp. AO068									2(2,2)				
<i>Firmicutes</i> sp. F058				1(1,1)						5(6,5)			1(1,1)
<i>Firmicutes</i> sp. MCE7_107												1(1,3)	
<i>Fusubacterium nucleatum</i>													1(1,1)
<i>G. proteobacterium</i> sp. UW042			1(1,2)										
<i>Gemella haemolysans</i>										2(2,6)			
<i>Gemella morbillorum</i>	26(31)		3(3,7)	8(8,8)	6(7,1)	1(1,1)		2(2,7)			2(2,8)		5(5,7)
<i>Gemella</i> sp. Strain 933-88	12(14)												
<i>Granulicatella adiacens</i>	2(2,4)						1(1,0)		3(3,3)		1(1,4)	2(2,6)	
<i>Granulicatella elegans</i>												1(1,3)	
<i>Kingella oralis</i>									1(1,1)				
<i>Lachnospiraceae</i> genomosp C1								1(1,4)					
<i>Lachnospiraceae</i> sp. MCE9_31					1(1,2)								
<i>Anaeroglobus germinatus</i>				30(33)		2(2,2)		2(2,7)		8(10)	1(1,4)	1(1,3)	14(16)
<i>Megasphaera</i> sp. BU057											5(7,0)		
<i>Megasphaera</i> sp. CS025										2(2,6)			
<i>Mogibacterium neglectum</i>		2(2,3)											
<i>Peptococcus</i> sp. IO70	2(2,4)												
<i>Peptococcus</i> sp. MCE10_265												1(1,3)	
<i>Peptostreptococcus micros</i>			3(3,7)		1(1,2)								
<i>Peptostreptococcus</i> sp. BS044				1(1,1)									
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>					5(5,9)			1(1,4)					
<i>Peptostreptococcus</i> sp. FG014			2(2,5)		4(4,7)							1(1,3)	
<i>Peptostreptococcus</i> sp. FL008													1(1,1)
<i>Peptostreptococcus</i> sp. HE064			1(1,2)										
<i>Peptostreptococcus</i> sp. HE064													1(1,1)
<i>Porphyromonas</i> sp. DA064							1(1,0)						
<i>Porphyromonas</i> sp. DA065			2(2,5)										
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>										1(1,3)			
<i>Selenomonas</i> sp. P2PA_80											2(2,8)	1(1,3)	
<i>Selenomonas</i> genomosp C2													13(15)
<i>Selenomonas infelix</i>		3(3,4)	7(8,6)			5(5,4)		5(6,8)				5(6,5)	
<i>Selenomonas noxia</i>		1(1,1)		4(4,4)			4(4,2)	1(1,4)	32(35)	7(9,1)	2(2,8)		6(6,9)

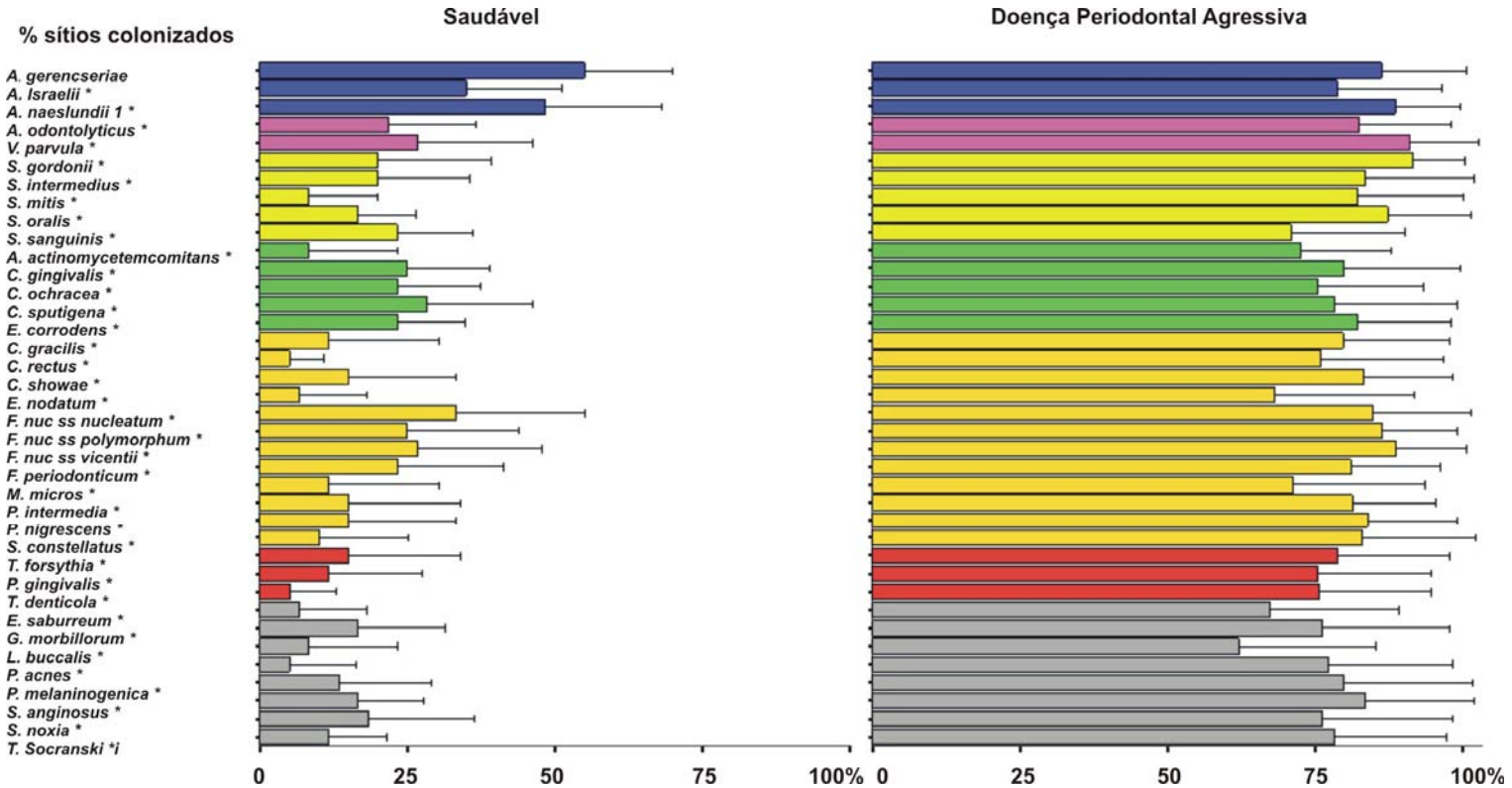
Espécie	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
<i>Filifactor alocis</i>			4(4,9)	1(1,1)		2(2,2)				2(2,6)		3(3,9)	
<i>Firmicutes</i> sp. AO068									2(2,2)				
<i>Firmicutes</i> sp. F058				1(1,1)						5(6,5)			1(1,1)
<i>Firmicutes</i> sp. MCE7_107												1(1,3)	
<i>Fusubacterium nucleatum</i>													1(1,1)
<i>G. proteobacterium</i> sp. UW042			1(1,2)										
<i>Gemella haemolysans</i>										2(2,6)			
<i>Gemella morbillorum</i>	26(31)		3(3,7)	8(8,8)	6(7,1)	1(1,1)		2(2,7)			2(2,8)		5(5,7)
<i>Gemella</i> sp. Strain 933-88	12(14)												
<i>Granulicatella adiacens</i>	2(2,4)						1(1,0)		3(3,3)		1(1,4)	2(2,6)	
<i>Granulicatella elegans</i>												1(1,3)	
<i>Kingella oralis</i>									1(1,1)				
<i>Lachnospiraceae</i> genomosp C1								1(1,4)					
<i>Lachnospiraceae</i> sp. MCE9_31					1(1,2)								
<i>Anaeroglobus germinatus</i>				30(33)		2(2,2)		2(2,7)		8(10)	1(1,4)	1(1,3)	14(16)
<i>Megasphaera</i> sp. BU057											5(7,0)		
<i>Megasphaera</i> sp. CS025										2(2,6)			
<i>Mogibacterium neglectum</i>		2(2,3)											
<i>Peptococcus</i> sp. IO70	2(2,4)												
<i>Peptococcus</i> sp. MCE10_265												1(1,3)	
<i>Peptostreptococcus micros</i>			3(3,7)		1(1,2)								
<i>Peptostreptococcus</i> sp. BS044				1(1,1)									
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>					5(5,9)			1(1,4)					
<i>Peptostreptococcus</i> sp. FG014			2(2,5)		4(4,7)							1(1,3)	
<i>Peptostreptococcus</i> sp. FL008													1(1,1)
<i>Peptostreptococcus</i> sp. HE064			1(1,2)										1(1,1)
<i>Peptostreptococcus</i> sp. HE064													1(1,1)
<i>Porphyromonas</i> sp. DA064							1(1,0)						
<i>Porphyromonas</i> sp. DA065			2(2,5)										
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>										1(1,3)			
<i>Selenomonas</i> sp. P2PA_80											2(2,8)	1(1,3)	
<i>Selenomonas</i> genomosp C2													13(15)
<i>Selenomonas infelix</i>		3(3,4)	7(8,6)			5(5,4)		5(6,8)				5(6,5)	
<i>Selenomonas noxia</i>		1(1,1)		4(4,4)			4(4,2)	1(1,4)	32(35)	7(9,1)	2(2,8)		6(6,9)

Espécie	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
<i>Selenomonas</i> sp. AA024					4(4,7)	1(1,1)			6(6,5)		2(2,8)		1(1,1)
<i>Selenomonas</i> sp. AJ036						9(9,7)							
<i>Selenomonas</i> sp. CI002											2(2,8)		
<i>Selenomonas</i> sp. CS002						5(5,4)							
<i>Selenomonas</i> sp. CS015				2(2,2)			4(4,2)						
<i>Selenomonas</i> sp. CS024									2(2,2)				
<i>Selenomonas</i> sp. DO042								1(1,4)					
<i>Selenomonas</i> sp. DS051				3(3,3)									
<i>Selenomonas</i> sp. EQ054						2(2,2)							
<i>Selenomonas</i> sp. EW011							2(2,1)						
<i>Selenomonas</i> sp. EW076					8(9,4)	3(3,2)	12(12)	4(5,5)	2(2,2)				2(2,3)
<i>Selenomonas</i> sp. EW079							1(1,0)	3(4,1)		2(2,6)	2(2,8)		
<i>Selenomonas</i> sp. EW084		1(1,1)				10(11)		3(4,1)			2(2,8)		
<i>Selenomonas</i> sp. EY047						3(3,2)							
<i>Selenomonas</i> sp. EZ011		3(3,4)				5(5,4)		2(2,7)					
<i>Selenomonas</i> sp. FNA3		1(1,1)											
<i>Selenomonas</i> sp. FT050						4(4,3)	16(17)	2(2,7)					
<i>Selenomonas</i> sp. GI064						5(5,4)		6(8,2)					
<i>Selenomonas</i> sp. GT010						3(3,2)	1(1,0)				2(2,8)		
<i>Selenomonas</i> sp. IK004								1(1,4)					
<i>Selenomonas</i> sp. IQ048							2(2,1)						
<i>Selenomonas</i> sp. IQ048					1(1,2)								
<i>Selenomonas</i> sp. JS031										2(2,6)			
<i>Selenomonas</i> sp. MB5_C08								2(2,7)					
<i>Selenomonas</i> sp. P2PA_80					1(1,2)		3(3,1)	3(4,1)		8(10)			
<i>Selenomonas</i> sp. GAA14				3(3,3)	20(23)								4(4,6)
<i>Selenomonas sputigena</i>	2(2,4)	4(4,6)	4(4,9)	6(6,6)	3(3,5)	18(19)	29(30)	13(18)	2(2,2)		5(7,0)		8(9,2)
<i>Shuttleworthia satelles</i>				1(1,1)									
<i>Solobacterium moorei</i>					3(3,5)		1(1,0)						
<i>Streptococcus anginosus</i>		50(57)		3(3,3)	3(3,5)		5(5,2)				3(4,2)		5(5,7)
<i>Streptococcus constellatus</i>	1(1,2)	4(4,6)		3(3,3)	1(1,2)			2(2,7)		2(3)	6(8,5)		5(5,7)
<i>Streptococcus cristatus</i>	3(3,6)			2(2,2)			1(1,0)		2(2,2)	15(20)	2(2,8)		
<i>Streptococcus gordonii</i>	18(21)												
<i>Streptococcus intermedius</i>		1(1,1)	17(21)		2(2,4)							3(3,9)	



Espécie	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
<i>Streptococcus mitis</i> bv2	7(8,3)			1(1,1)				10(14)	4(4,3)	2(2,6)			
<i>Streptococcus mitis/pneumoniae</i>			3(3,7)	2(2,2)	3(3,5)		3(3,1)		2(2,2)	3(3,9)	6(8,5)	5(6,5)	2(2,2)
<i>Streptococcus oralis</i>													1(1,1)
<i>Streptococcus parasanguinis</i>		1(1,1)											
<i>Streptococcus sanguinis</i>			1(1,2)			1(1,1)		1(1,4)	6(6,5)			6(7,8)	
<i>Streptococcus</i> sp. AY020	1(1,2)						1(1,0)						
<i>Streptococcus</i> sp. EK048			4(4,9)										
<i>Streptococcus</i> sp. FN042										2(2,6)			
<i>Streptococcus</i> sp. FX003			9(11,1)										
<i>Streptococcus</i> sp. H3-M2										2(2,6)			
<i>Streptococcus</i> sp. strain 7A					1(1,2)	4(4,3)	4(4,2)					2(2,6)	
<i>Streptococcus</i> sp. UR053		1(1,1)											
<i>Treponema</i> II:13			3(3,7)										
<i>Treponema</i> IV sp. JU025			1(1,2)										
<i>Treponema</i> V sp. AT040											1(1,4)		
<i>Treponema vincentii</i>										2(2,6)			
<i>Veillonella atypica</i>		1(1,1)											
<i>Veillonella parvula/dispar</i>	3(3,6)	8(9,2)		4(4,4)		2(2,2)		2(2,7)		1(1,3)	12(17)	2(2,6)	3(3,4)
<i>Veillonella</i> sp. AA050			8(10)		1(1,2)	2(2,2)							
<i>Veillonella</i> sp. BU083				4(4,4)									
Total de clones	84	87	81	91	85	93	96	73	92	77	71	77	87

## ANEXO 5



Perfil microbiano do percentual de sítios colonizados por níveis superiores ou iguais  $10^4$  células das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Análise de covariância ajustada para idade: \*  $p < 0,05$ . Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas segundo SOCRANSKY et al. (1991).