

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

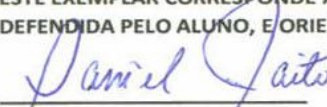
ITALO SARTO CARVALHO RODRIGUES

**ANÁLISE DE DIVERSIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO BIOFILME
DENTÁRIO POR POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE
FRAGMENTOS TERMINAIS DE RESTRIÇÃO (T-RFLP)**

DISSERTAÇÃO de MESTRADO APRESENTADA A
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM BIOLOGIA BUCO-DENTAL, NA ÁREA
DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA.

**ORIENTADOR: PROF. DR DANIEL SAITO
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. DANIEL SAITO.


Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
GARDÊNIA BENOSSI – CRB8/8644 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

R61a

Rodrigues, Italo Sarto Carvalho, 1983-
Análise da diversidade bacteriana associada ao biofilme
dentário por Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos
Terminais de Restrição (T-RFLP) / Italo Sarto Carvalho
Rodrigues. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Daniel Saito.
Coorientador: José Francisco Hofling
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Doença periodontal. 2. Infecção. 3. Biologia molecular. 4.
Placa dentária. I. Saito, Daniel. II. Hofling, José Francisco. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia
de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of bacterial diversity associated with dental biofilm by
Terminals Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Palavras-chave em Inglês:

Periodontal disease

Infection

Molecular biology

Dental plaque

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Daniel Saito [Orientador]

Marli de Fátima Fiore

Renata de Oliveira Mattos-Graner

Data da defesa: 06-07-2011

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 06 de Julho de 2011, considerou o candidato ITALO SARTO CARVALHO RODRIGUES aprovado.


Prof. Dr. DANIEL SAITO


Profa. Dra. MARLI DE FÁTIMA FIORE


Profa. Dra. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

Dedico este trabalho à minha família, especialmente,
aos meus pais que, apesar da distância e
de meus momentos de ausência, sempre
estiveram ao meu lado sendo
meus maiores inspiradores e
apoiadores na busca de meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Saito, meu orientador, que me acompanhou no decorrer do programa e desenvolvimento dessa pesquisa, depositando confiança e proporcionando meu amadurecimento na formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling, chefe do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP-UNICAMP e meu coorientador, sempre receptivo, pude contar com seu apoio durante essa caminhada.

À Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner, professora da área de Microbiologia e Imunologia, sempre estimulando meu crescimento em minha jornada de conhecimento.

Aos meus amigos, companheiros de laboratório e dia-a-dia, do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental Erika Nikitza Shiauha Harth Chu, Fabiana Peganotti Roque, Iza Teixeira Alves Peixoto, Janaina de Cássia Orlandi Sardi, Mariana Ferreira Dib João, Natália Leal Vizoto, Paula Cristina Aníbal, Sérgio Eduardo Braga Cruz, Tarcila de Camargo. Em especial a Andressa Monteiro Venturini, Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, Julianna Joanna de Carvalho Moraes e Rafael Nóbrega Stipp, que me apoiaram bastante durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, professor do Departamento de Histologia e Embriologia, amigo, que sempre me apoiou nos momentos difíceis.

Aos professores do Departamento de Periodontia, Prof. Dr. Enilson Sallum e Prof. Dr. Márcio Casati, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e aos pós-graduandos, Hugo Vale, Lucas Queiroz, Lucas Moura e Tiago Taiete, que gentilmente permitiram a utilização da clínica de pós-graduação e a coleta de amostras.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai, chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do CENA-USP, por ceder a utilização de sua estrutura e fornecer apoio a minha pesquisa.

Ao Dr. Lucas William Mendes e ao técnico Fábio Duarte, do CENA-USP, que me ajudaram em passos delicados e imprescindíveis na produção desse trabalho.

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, professora do CENA-USP, que contribuiu no enriquecimento desse trabalho.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, por ter me acolhido permitindo meu engrandecimento profissional e pessoal

A CAPES, pelo apoio financeiro durante o programa de mestrado.

Agradeço sinceramente a todos que de forma direta e indireta contribuíram para tornar possível esse trabalho.

“Life is what happens
to you while you’re busy
making other plans.”

John Lennon

RESUMO

As comunidades bacterianas presentes na cavidade bucal desempenham papel importante no equilíbrio saúde/doença em seres humanos. Nesse sentido, o estudo da composição de microambientes orais pode contribuir para uma melhor precisão no diagnóstico de doenças infecciosas e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes. A periodontite é uma doença dos tecidos de suporte do dente, caracterizada por resposta imunológica exacerbada do hospedeiro, frente à presença bacteriana no biofilme dentário. A grande diversidade bacteriana observada na cavidade bucal, aliada aos variados quadros clínicos da periodontite, ressaltam a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre a composição bacteriana periodontopatogênica. O objetivo deste trabalho é a caracterização da comunidade bacteriana associada ao biofilme periodontopatogênico, pelo uso da técnica de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP). Amostras de biofilme dentário supragengival e subgengival foram coletadas de 11 pacientes portadores de periodontite. O DNA amostral foi extraído e submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) direcionada ao gene ribossomal 16S, utilizando-se iniciador senso marcado com molécula repórter fluorescente. Os produtos da PCR foram digeridos pelas endonucleases tetraméricas *HhaI*, *MspI* e *RsaI* e os fragmentos terminais de restrição (T-RFs) resultantes foram analisados em um sequenciador automatizado de DNA, gerando diferentes perfis de fragmentos para cada amostra. Ao todo, 19 T-RFs distintos foram detectados com a enzima *RsaI* (média = 6,4), 61 com *MspI* (média = 19,3) e 63 com *HhaI* (média = 16,3). Uma grande variabilidade nos perfis de restrição foi observada, sendo que 51% a 63% dos T-RFs foram detectados em menos de quatro amostras. A predição taxonômica de T-RFs *in silico* demonstrou a presença de gêneros bacterianos reconhecidamente periodontais, incluindo *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*,

Porphyromonas, *Prevotella* e *Propionibacter*. Embora alguns gêneros tenham sido encontrados em todas as amostras avaliadas, as análises de clusterização e estatística multivariada não demonstraram agrupamentos de perfis T-RFLP conforme paciente ou sítio amostral. Os resultados do estudo permitem concluir que a comunidade bacteriana do biofilme periodontopatogênico é bastante variável entre indivíduos, embora possua alguns gêneros predominantes.

Palavras-chave: doença periodontal, infecção, T-RFLP, 16S rDNA, biofilme.

ABSTRACT

The bacterial communities present in the oral cavity play an important role in maintaining health/disease equilibrium. In this sense, studying the microbial composition of the oral environment may contribute to attain a better precision in diagnosis of infectious diseases and, also, to develop efficient therapeutic approaches. Periodontitis is a disease that affects the supporting tissues of the tooth, characterized by a heightened immunologic response to bacteria present in dental biofilm. The broad microbial diversity present in the oral cavity, along with the various clinical features of periodontitis, highlight the necessity of further investigations on the composition of periodontopathic biofilm. The objective of this study is the characterization of the bacterial communities associated with periodontopathic biofilm, by use of the Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) technique. Supra and subgingival biofilm samples were collected from 11 periodontitis subjects. Total DNA was extracted from the samples and submitted to the Polymerase Chain Reaction (PCR) targeting the 16S rRNA gene, with a fluorescently labeled forward primer. PCR products were digested with the tetrameric endonucleases *HhaI*, *MspI* and *RsaI*, and the resulting terminal restriction fragments (T-RFs) were analyzed in an automated DNA sequencer. In all, 67 T-RFs (mean = 17.3) were detected with *RsaI* endonuclease, 61 T-RFs with *MspI* (mean = 19.3) and 19 T-RFs (mean = 6.4) with *HhaI*. A great variability in the restriction patterns was observed, since 51% to 63% of T-RFs were detected in less than 4 samples, and two T-RFs were exclusively found in supragingival biofilm ($p = 0.018$). In silico taxonomical prediction of T-RFs demonstrated the presence of well-known periodontal species belonging to the *Acinomyces*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Prevotella* and *Propionibacter* genera. Although some species were found in all samples, clustering and multivariate statistical analysis did not reveal evident groupings of T-

RFLP profiles according to patient or sampling site. The results of this study indicate that the microbiota of periodontopathic biofilm is highly variable among subjects, albeit a core microbial community may be observed.

Keywords: periodontal disease, infection, T-RFLP, 16S rDNA, biofilm.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rDNA	- Gene que codifica o RNA ribossomal da subunidade 30S do ribossomo de bactérias
6-FAM	- 6-carboxifluoresceína
<i>HhaI</i>	- Endonuclease de restrição tetramérica com sítio de reconhecimento GCG ^A C
MEGA	- <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
<i>MspI</i>	- Endonuclease de restrição tetramérica com sítio de reconhecimento C ^A CGG
PAST	- Paleontological Statistics Software for Education and Data Analysis
pb	- Pares de bases
PCA	- Análise de Componentes Principais
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
rRNA	- RNA ribossomal
<i>RsaI</i>	- Endonuclease de restrição tetramérica com sítio de reconhecimento GT ^A AC
TE	- TRIS-EDTA, tris(hidroximetil)aminometano + ácido etilenodiamino tetra-ácetico
T-RFLP	- Análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição
T-RF	- Fragmento Terminal de Restrição
T-RF ^(H)	- Fragmento Terminal de Restrição obtido com a enzima <i>HhaI</i>
T-RF ^(M)	- Fragmento Terminal de Restrição obtido com a enzima <i>MspI</i>
T-RF ^(R)	- Fragmento Terminal de Restrição obtido com a enzima <i>RsaI</i>
UPGMA	- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. PROPOSIÇÃO	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	17
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	33
8. REFERÊNCIAS	34
9. APÊNDICES	41
10. ANEXOS	72

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos presentes na cavidade oral participam diretamente da homeostase em seres humanos, além de desempenharem funções na defesa contra microrganismos exógenos potencialmente patogênicos. Nesse sentido, o estudo da composição de microambientes bucais pode contribuir para uma melhor precisão no diagnóstico de doenças infecciosas e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes (van der Waaij *et al.*, 1971; Løe, 1981; Marsh P, 2003; Jekinson & Lamont, 2005; Pennisi, 2005; Avila *et al.*, 2009).

A periodontite é uma doença dos tecidos de suporte do dente, caracterizada por resposta imunológica exacerbada do hospedeiro, frente à presença microbiana no biofilme dentário. A grande diversidade microbiana observada na cavidade bucal, aliada aos variados quadros clínicos da periodontite, ressaltam a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre a composição da comunidade bacteriana periodontopatogênica (Løe, 1981; Socransky *et al.*, 1998; Paster *et al.*, 2001; Haffajee *et al.*, 2008).

No microambiente oral, comunidades de microrganismos organizados em biofilme podem ser encontradas na região supragengival, ou seja, acima ou no nível da margem gengival, como também na região subgengival, abaixo da margem gengival, entre os dentes e o tecido do sulco gengival (Haake *et al.*, 2004). Apesar da proximidade entre ambos os tipos de biofilme, o supragengival apresenta morfologia e composição bacteriana bastante distinta, quando comparada ao subgengival (Listgarden, 1976).

O biofilme formado sobre a superfície dentária representa um massivo acúmulo bacteriano composto, em sua maioria, por microrganismos naturalmente presentes na cavidade bucal. Sem os cuidados de higienização e prevenção adequados, a composição bacteriana do biofilme aumenta em tamanho e

complexidade. O agregado de biofilme e cálculo dentário promove o desenvolvimento de inflamação dos tecidos gengivais e sua ausência está associada ao estado de saúde desses tecidos. Diversos mecanismos diretos ou indiretos, como endotoxinas e ácidos orgânicos liberados por microrganismos do biofilme, ou liberação de mediadores de resposta imune do hospedeiro levando a destruição tecidual, podem causar mudanças na superfície dos tecidos e progressivamente destruir o tecido de suporte e osso alveolar (Løe, 1981).

A complexidade da comunidade bacteriana presente no biofilme dentário e os variados quadros clínicos das doenças infecciosas bucais, principalmente a complexidade da doença periodontal, ressaltam a necessidade de investigações mais detalhadas sobre os mecanismos de patogenicidade desempenhados por tais microrganismos. Em especial, existe hoje uma carência de estudos voltados a comparação da comunidade bacteriana do biofilme supra e subgengival em casos associados a periodontite.

A análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) é uma técnica de caracterização molecular que permite a avaliação de comunidades bacterianas complexas e comparação rápida da estrutura de comunidades e da diversidade de diferentes ecossistemas, de forma independente de cultivo (Liu *et al.*, 1997; Takeshita *et al.*, 2007). Nesse sentido, T-RFLP possui alta aplicabilidade no estudo do biofilme dentário periodontopatogênico, permitindo uma visão abrangente da comunidade bacteriana supra e subgengival e possibilitando a identificação de possíveis diferenças na composição destas comunidades, englobando espécies cultivadas e não cultivadas (Sakamoto *et al.*, 2003a, 2004).

2. REVISÃO DA LITERATURA

O relacionamento entre os hospedeiros e os microrganismos da comunidade bacteriana normal tem início logo após o nascimento e persiste por toda a vida do indivíduo. Acredita-se que somente uma entre dez células do nosso corpo são propriamente de origem humana (Avila *et al.*, 2009). Em parte, a presença destes procariotos torna-se indispensável ao hospedeiro, uma vez que eles desempenham funções biológicas importantes, como a produção de vitamina K, participando também diretamente de processos fisiológicos como a renovação das células de revestimento intestinal (Pennisi, 2005, Avila *et al.*, 2009).

A comunidade bacteriana normal participa também dos mecanismos proteção do hospedeiro, impedindo a colonização das superfícies mucosas por patógenos extrínsecos, agindo assim como barreira funcional (van der Waaij *et al.*, 1971; Jekinson & Lamont, 2005; Avila *et al.*, 2009). A importância que a comunidade bacteriana exerce em seus hospedeiros pode ser evidenciada em animais, os quais apresentam alterações nas superfícies mucosas, baixa absorção de nutrientes, deficiências alimentares e prejuízos em atividades realizadas pelo sistema imune (van der Waaij *et al.*, 1971; Marsh P, 2003). Diante desses achados, uma melhor compreensão da composição da comunidade bacteriana normal pode contribuir para o aprimoramento de ferramentas utilizadas no diagnóstico, bem como no desenvolvimento de tratamentos mais específicos para diferentes as doenças bacterianas, buscando melhorar a saúde dos indivíduos (Avila *et al.*, 2009).

Microrganismos que compõem a comunidade bacteriana normal encontram-se amplamente distribuídos em nosso organismo. A cavidade bucal, juntamente com a mucosa intestinal, são os locais cuja população microbiana é mais abundante. As comunidades presentes na cavidade bucal são compostas de diferentes gêneros e espécies microbianos que crescem originando estruturas denominadas biofilmes. Detalhadamente, os biofilmes são compostos de

comunidades microbianas altamente organizadas, que se tornaram fenotipicamente distintas de seus homólogos planctônicos (Stoodley *et al.*, 2002). Há variações entre composições de comunidades no que se refere à presença de bactérias, arqueias, de fungos e de vírus, mesmo em cavidades orais saudáveis (Slots, 2007; Avila *et al.*, 2009; Sardi *et al.*, 2010). De forma geral, estes microrganismos são produtores de polímeros extracelulares que originam a matriz orgânica do biofilme, favorecendo o desenvolvimento de agregado microbiano sobre as superfícies dos dentes, gengiva, língua, próteses ou qualquer outro material sólido não descamativo (Lang *et al.*, 1997; Marsh P, 2004, 2006). Adicionalmente, para completa formação do biofilme dentário, ainda é necessária a presença de produtos do exsudato do sulco gengival e/ou da saliva (Lang *et al.*, 1997).

De acordo com Jekinson & Lamont (2005), a imensa quantidade de microrganismos que compõe estas comunidades provavelmente não possa sobreviver fora do biofilme. Isto ocorre, em parte, devido a adaptações metabólicas sofridas pelos microrganismos, as quais maximizam o potencial de crescimento numérico neste ambiente. Tais adaptações tornam-se importantes para espécies de bactérias que enfrentam uma grande competitividade para sobreviverem no biofilme (Jekinson & Lemont, 2005). Ainda, este desafio pode tornar-se maior dependendo do tipo de superfície em que o microrganismo está aderido e de quais são as características físicas e metabólicas apresentadas pelas bactérias que crescem adjacentes a ele (Jekinson & Lemont, 2005).

As bactérias encontradas no biofilme dentário são fortemente influenciadas por fatores do ambiente bucal, como pH, temperatura, potencial redox, condições atmosféricas e salinidade. Adicionalmente, alguns dos fatores podem ser mediados pelo hospedeiro, dentre eles higiene bucal, movimentos linguais, alimentação, hábitos deletérios e o uso de determinados medicamentos (Haake *et al.*, 2004; Kolenbrander *et al.*, 2006; Avila *et al.*, 2009).

As populações comensais, dentro de seu microambiente, geralmente não causam danos para o hospedeiro; pelo contrário, podem controlar o desenvolvimento de espécies patogênicas por dificultar a aderência das mesmas em superfícies mucosas (Jekinson & Lamont, 2005). No entanto, os microrganismos presentes em tais comunidades tiram proveito de algumas características fornecidas pelo biofilme para evadirem de diversos mecanismos de proteção imune do hospedeiro, bem como da ação de substâncias tóxicas produzidas pelo hospedeiro, ou por outros microrganismos. Ainda, os microrganismos que crescem em biofilmes possuem algumas facilidades no processamento e captação de alimentos, na troca de material genético e na comunicação entre as células adjacentes (*quorum sensing*). Tais interações podem melhorar a capacidade de adaptação ao microambiente e, conseqüentemente, aumentar as chances de sobrevivência frente às adversidades ambientais (Socransky & Haffajee, 2002; Marsh P, 2004).

O biofilme supragengival é caracterizado pela abundante presença de bacilos e cocos Gram-positivos, com predomínio de bactérias do gênero *Streptococcus*, mas outras espécies como *Veillonella* e *Actinomyces* também estão presentes nestas comunidades. Contudo, no biofilme subgengival, os organismos Gram-negativos, anaeróbios e móveis constituem a maioria. Neste, as bactérias mais encontradas são do gênero *Porphyromonas*, as quais também podem ser encontradas ocasionalmente nos biofilmes supragengivais (Løe, 1981; Rosan & Lamont, 2000; Socransky & Haffajee, 2002; Marsh P, 2003b; Haffajee *et al.*, 2008; Palmer, 2010).

Atualmente, as diferentes manifestações clínicas que são definidas, em conjunto, como doença periodontal, representam uma variedade de alterações infecciosas que afetam os tecidos de suporte dentário. Tradicionalmente, a doença periodontal é dividida em gengivite e periodontite. Gengivite relaciona-se com o quadro de doença inflamatória limitada a gengiva, sem evidências clínicas de perda de fibras do ligamento periodontal ou osso alveolar, e com profundidade de

bolsa variando entre 2 e 4 mm. Periodontite denota um quadro de destruição inflamatória dos tecidos do ligamento periodontal e suporte ósseo (Slots, 2007). Doenças inflamatórias bucais, tanto dos tecidos periodontais como dos tecidos dentais propriamente ditos, resultam de um desequilíbrio nas condições ambientais e/ou fatores associados ao hospedeiro que desencadeiam mudanças na comunidade bacteriana, permitindo o crescimento significativo de bactérias oportunistas ou patogênicas. Os indivíduos com comprometimento periodontal, por exemplo, apresentam maior variedade de microrganismos subgengivais quando comparados com pacientes com periodonto saudável (Kolenbrander *et al.*, 2006).

Algumas espécies bacterianas presentes na comunidade bacteriana bucal são frequentemente associadas a diversos quadros patológicos. Dentre elas, *Streptococcus mutans* estão relacionados com o desenvolvimento de cáries; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, com doença periodontal agressiva; *Tannerella forsythia*, com doenças gengivais e falha em implantes; *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* com doenças inflamatórias do periodonto e *Streptococcus gordonii* com o desenvolvimento de biofilme oral (Rosan & Lamont, 2000; Pennisi, 2005).

Diante de tantos estudos, ainda existe dificuldade em distinguir os microrganismos que compõe o biofilme saudável e o biofilme patogênico. De que maneira caracterizar espécies presentes tanto nos casos de saúde como nos casos de doença? Será que todos os microrganismos participantes desse mecanismo etiológico já são conhecidos? Ou ainda, precisaríamos atentar para fatores até então desconhecidos? A riqueza de espécies (o número de espécies dentro de uma comunidade) e equidade de espécies (os tamanhos das populações de espécies dentro de uma comunidade) são dois parâmetros essenciais para a definição de estrutura e diversidade bacteriana. Aplicados a complexidade do biofilme bucal, fica demonstrada a necessidade de investigações diferenciadas (Socransky *et al.*, 1998; Paster *et al.*, 2001; Aas *et al.*, 2005; Avila *et al.*, 2009; Palmer, 2010; Teles *et al.*, 2011).

Técnicas baseadas nos métodos clássicos para a análise da comunidade bacteriana bucal dependentes do cultivo e isolamento em laboratório não abrangem, de forma representativa, grande parte das comunidades microbianas e, portanto, não preenchem os requisitos para o estudo estrutural e de diversidade das comunidades microbianas bucais. Adicionalmente, as técnicas clássicas de identificação microbiana geralmente são onerosas, trabalhosas e demandam períodos prolongados para o crescimento dos microrganismos. Ainda, a dificuldade nas identificações se agrava em consequência de algumas espécies serem extremamente fastidiosas, ao ponto de não apresentarem crescimento nos meios de cultivos até então conhecidos (Liu *et al.*, 1997; Aas *et al.*, 2005; Avila *et al.*, 2005), o que leva, muito comumente, a uma subestimativa da diversidade bucal (Paster *et al.*, 2001; Aas *et al.*, 2005; Avila *et al.*, 2009)

Na última década, diversos autores desenvolveram trabalhos voltados exclusivamente para contribuir na compreensão da composição mais exata das comunidades orais, agregando conhecimento aos processos etiopatológicos das doenças orais e na constante busca de novas e melhores formas de tratamento ou prevenção. Assim, técnicas de biologia molecular independentes de cultivo, baseadas na análise do gene de 16S rRNA (gene que codifica RNA ribossomal da subunidade menor de ribossomos, também denominado 16S rDNA) foram desenvolvidas para analisar as comunidades bacterianas com menor custo, tempo e com maior capacidade de produção de dados (Takeshita *et al.*, 2007). Usando essa abordagem, tem-se revelado uma grande diversidade microbiana na cavidade bucal humana, que não havia sido detectada previamente. Nesse contexto, hoje constata-se que a cavidade bucal humana é habitada por cerca de 500 a 700 espécies de bactérias (Paster *et al.*, 2001; Kazor *et al.*, 2003; Aas *et al.*, 2005; Avila *et al.*, 2009) e que 50% dessas bactérias são difíceis ou impossíveis de serem cultivadas por métodos convencionais (Paster *et al.*, 2001).

Atualmente, a técnica mais empregada e que oferece melhores resultados para explorar a diversidade microbiana envolve o isolamento do DNA do

microambiente de estudo, seguido da amplificação de 16S rDNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), clonagem dos fragmentos amplificados em *Escherichia coli* e sequenciamento dos insertos clonados (Paster *et al.*, 2001; Kazor *et al.*, 2003; Aas *et al.*, 2005; Avila *et al.*, 2009). No entanto, analisar individualmente clones de 16S rDNA é um método bastante trabalhoso e relativamente caro para comparar várias comunidades bacterianas (Takeshita *et al.*, 2007).

O estudo de comunidades pela análise qualitativa de perfis de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) permite uma maior correlação entre a frequência de amostragem e a resolução filogenética (Liu *et al.*, 1997; Marsh T, 1999; Takeshita *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2009). Em resumo, a técnica emprega a PCR, tendo como alvo um gene de interesse, como o gene 16S rRNA, que é amplificado com um dos iniciadores marcado por fluorescência na extremidade 5'. Fragmentos terminais de restrição (T-RFs), com comprimentos específicos para os diferentes gêneros da comunidade do biofilme bucal, são então obtidos pela digestão por endonucleases dos produtos dessa PCR. Os T-RFs são, em seguida, analisados em um sequenciador automático de DNA. Sequências de T-RFs são arquivadas em bancos de dados virtuais que podem ser acessados através da internet, permitindo assim a predição de gêneros (Marsh T, 2000; Kent *et al.*, 2003).

Embora T-RFs gerados por digestão com uma endonuclease têm, por vezes, o mesmo comprimento em vários gêneros bacterianas diferentes, a especificidade pode ser aumentada digerindo-se o DNA com diferentes tipos de enzimas (Marsh T, 1999; Dunbar *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2005). Os T-RFs marcados com o fluoróforo são convertidos em um eletroferograma. Através dele, pode-se observar a formação de espectros que representam um T-RF específico. O processamento dos dados se dá pela conversão dos eletroferogramas em uma matriz, cada coluna representando uma amostra estudada e cada linha representando uma T-RF que é encontrada em

uma amostra. As opções de software utilizadas para comparação e identificação das matrizes, indicando gêneros bacterianos, incluem o GeneScan™ ou Gene Mapper™ (ABI) e PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems) ou um software tal como GelComparII (Applied-Maths), que pode importar dados não processados de arquivos de eletroferogramas. Estes programas calculam o tamanho do fragmento de restrição terminal bem como a intensidade de fluorescência, representada altura ou área do pico. O comprimento do fragmento de restrição pode ser determinado pela base de dados ribossomais completa e, conseqüentemente, proporcionar um ponto de partida filogenético lógico.

T-RFLP foi originalmente utilizada para análise de amostras ambientais, obtidas dos mais variados locais, como fontes hidrotermais submarinas, solo, plantações de arroz, comunidades anóxicas, água de centros de tratamento de esgoto, em solo contaminado com petróleo, dentre outros (Wilderer & Charaklis, 1989; Moyer *et al.*, 1994; Chin *et al.* 1999; Bruce & Hughes, 2000; Bordanave *et al.*, 2007). Com essa capacidade multifacetada, abordagens independentes de cultivo, como a T-RFLP, são úteis também para o estudo ecológico das mais variadas comunidades microbianas, inclusive as que vivem no ser humano (Munson *et al.*, 2002; Nagashima *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 2003a, 2003b, 2004; Rogers *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2009; Vianna *et al.*, 2009).

Nessa última década, diversos autores desenvolveram trabalhos voltados exclusivamente para ampliar conhecimentos sobre a composição das comunidades orais, agregando conhecimento aos processos etiolopatológicos das doenças orais, na constante busca de novas e melhores formas de tratamento ou prevenção de doenças. T-RFLP já foi empregada em estudos que visavam contrastar a composição bacteriana entre saliva de pacientes com saúde e doença periodontal (Sakamoto *et al.*, 2003a), para monitorar mudanças no perfil microbiano subgengival após o tratamento e mudanças de hábitos deletérios (Sakamoto *et al.*, 2004; Fullmer *et al.*, 2009), investigar a qualidade de restaurações coronárias, da radioterapia sobre a composição bacteriana

endodôntica (Hommez *et al.*, 2004, 2008) e para comparar comunidades bacterianas de amostras intraradiculares, avaliando o comprometimento endodôntico (Sakamoto *et al.*, 2006; Hall, 2008; Saito *et al.*, 2009).

De acordo com Hommez *et al.* (2004), a técnica T-RFLP, além de permitir uma rápida avaliação da diversidade de bactérias em amostras do canal radicular, também revelou a presença de bactérias que têm sido raramente descritas nos canais radiculares de dentes com periodontite apical. Estes dados sugerem uma vasta aplicabilidade da técnica em outras áreas odontológicas, com o intuito de que se encontrem mais informações sobre as comunidades presentes em outros sítios bucais.

Dada a grande aplicabilidade da técnica de T-RFLP no estudo da microbiota bucal, o presente estudo visa determinar a estrutura das comunidades bacterianas em amostras de biofilme bucal supragengival e subgengival pela aplicação da técnica em amostras provenientes de pacientes portadores de periodontite. Espera-se, como produto desta confrontação, a eventual caracterização e identificação das inúmeras bactérias constituintes do biofilme periodontopatogênico.

3. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo a aplicação da técnica de T-RFLP no estudo das comunidades bacterianas presentes no biofilme dentário periodontopatogênico, buscando-se:

- 1) A caracterização das comunidades bacterianas presentes em amostras de biofilme dentário de pacientes portadores de periodontite, pela técnica de T-RFLP.
- 2) A predição dos gêneros mais prevalentes nas comunidades analisadas.
- 3) A comparação dos perfis bacterianos dos microambientes orais supra e subgengival, intra e entre pacientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Informações sobre os indivíduos participantes da pesquisa

Ao todo, foram incluídos 11 indivíduos com média de idades dentro dos 40 anos, de ambos os gêneros, 8 portadores de doença periodontal crônica e 3 de agressiva, generalizadas, previamente encaminhados para tratamento periodontal na Clínica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Para maiores detalhes, observar a Tabela 4, nos apêndices. A participação dos mesmos na pesquisa foi voluntária. Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, segundo a Resolução nº196/96 das Normas do Conselho Nacional de Saúde, contendo as informações a respeito do projeto de pesquisa, seus objetivos, riscos e consequências. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP sob número 075/2008, conforme as normas estabelecidas pelo SISNEP para pesquisas em indivíduos humanos (Certificado no Anexo).

4.2 Seleção dos participantes

A seleção dos participantes da pesquisa foi conduzida respeitando-se os seguintes critérios:

- a) Critérios de inclusão: pacientes portadores de periodontite, possuindo pelo menos 15 elementos dentários, com pelo menos seis deles apresentando um sítio com profundidade a sondagem de, no mínimo, 5 mm e nível de inserção entre 5 e 10 mm, excluindo-se os terceiros molares (Socransky & Haffajee, 1998).
- b) Critérios de exclusão: uso de terapia antibiótica, tratamento periodontal, ou antissépticos orais nos seis meses anteriores à data da coleta; história de

doença sistêmica; fumantes; pacientes grávidas ou em fase de amamentação (Socransky & Haffajee, 1998).

4.3 Coleta de amostras de biofilme supragengival

Inicialmente, todos os pacientes foram submetidos à anamnese, para a obtenção de informações sobre a história médica e odontológica, e ao exame clínico, radiográfico e à sondagem periodontal. As amostras de biofilme supragengival foram colhidas com curetas Gracey do tipo convencional (Trinity) esterilizadas (Socransky & Haffajee, 1998), posicionadas na porção dentária diretamente superior a margem da gengiva livre e removidas com força de raspagem convencional. A cureta foi passada em toda a superfície da face lisa do dente, no sítio selecionado. Amostras foram coletadas no sítio mais afetado, dos seis dentes mais comprometidos com o quadro da doença. As amostras foram imediatamente depositadas individualmente em um microtubo plástico de 1,5 mL, contendo tampão Tris-EDTA pH 8.0. Posteriormente, o microtubo foi devidamente identificado e imediatamente transportado ao laboratório e acondicionado a -20 °C até o momento de uso.

4.4 Coleta de amostras de biofilme subgengival

A coleta de biofilme subgengival foi realizada após a remoção do biofilme supragengival. Inicialmente, a região supragengival adjacente ao sítio de coleta do material foi devidamente limpa e seca com rolos de algodão ou gaze esterilizados. Amostras foram coletadas no sítio mais afetado, dos seis dentes mais comprometidos com o quadro da doença. A coleta foi feita com curetas Gracey do tipo mini-five (Trinity) esterilizadas (Socransky & Haffajee, 1998), posicionadas na porção mais apical e removidas com força de raspagem convencional, até os limites da borda da gengiva livre. As amostras foram imediatamente depositadas individualmente em um microtubo plástico de 1,5 mL, contendo tampão Tris-EDTA

pH 8.0. O microtubo foi devidamente identificado e acondicionado a -20°C até o momento do uso.

4.5 Amplificação do DNA amostral pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Extração do DNA baseado em método modificado de Doyle & Doyle (1990). Para a amplificação do 16S rDNA bacteriano, foram utilizados o iniciador universal senso 27F com marcador fluorescente 6-FAM na extremidade 5' e o iniciador universal não marcado antisenso 1492R (53). A amplificação foi realizada em uma mistura de reação de 50 μL contendo: 10 a 30 ng de DNA extraído, 5 U Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão PCR 1x (de acordo com o fabricante), 200 μM de dNTPs e 0,1 μM de cada iniciador. As amostras foram aquecidas a 94°C por 3 min e depois amplificadas por 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 59°C por 45 s, e extensão a 72°C por 1 min; após estes ciclos, a extensão final foi feita por 15 min em um termociclador T1 Termoblock (Biometra). Para testar a eficácia da reação, alíquotas de 2 μL dos produtos da PCR de 16S rDNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,9% e visualizados por coloração com brometo de etídio em fotodocumentador.

4.6 Purificação dos Produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band* (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante, o DNA foi armazenado a -20°C até a próxima análise.

4.6 Reação de Restrição dos Produtos de PCR para Análise de T-RFLP

Os produtos de PCR purificados foram utilizados separadamente nas reações de restrição com as endonucleases tetraméricas *HhaI* (GCG[^]C), *MspI* (C[^]CGG) e *RsaI* (GT[^]AC). Nas reações, foram utilizados 1,5 µL do tampão React 10X; 0,15 µL de BSA 1 ng/µl; 0,06 µL da endonuclease 20U (New England Biolabs); 5 µL do produto de PCR purificado e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para o volume final de 15 µl. As reações de restrição foram realizadas em termociclador T1 Termoblock (Biometra) nas seguintes condições: 37°C por 2 horas e 65°C por 20 min para inativação da endonuclease.

4.7 Precipitação dos Produtos de Digestão

Após a reação de restrição os produtos digeridos foram precipitados para análise de fragmentos no sequenciador automático. Para a precipitação foram adicionados 2 µl de tampão acetato de sódio/ EDTA, mais 60 µl de etanol absoluto, a 15 µl do produto da digestão. A mistura foi agitada levemente no vórtex e centrifugada por 15 min a 12.000 x *g*, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 150 µl de etanol a 70% recém preparado e centrifugou-se a 12.000 x *g* por 5 min. O sobrenadante foi eliminado e o precipitado foi seco em AccuBlock Digital Dry Bath D1200 (Labnet) a 45°C por aproximadamente 20 min. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior utilização. No momento da análise pelo sequenciador, as amostras foram ressuspensas com 10 µl de formamida HiDi.

4.8 Análise de Polimorfismo de Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP) do gene 16S rRNA

A análise dos fragmentos terminais de restrição (T-RFs) foi feita em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Antes do carregamento, as amostras foram desnaturadas por 5 min

a 95°C e resfriadas a 0°C por 4 min. Em seguida, o produto precipitado foi ressuspensionado em mistura contendo 9,75 µl de formamida HiDi e 0,25 µl de padrão de comprimento GeneScan® – 500 ROX® Size Standard (Applied Biosystems).

4.9 Análise dos dados

Os eletroferogramas foram visualizados no programa GeneScan (Applied Biosystems). Para cada amostra, foi gerado um arquivo com as informações sobre o tamanho dos fragmentos, intensidade de fluorescência e área dos picos foi exportado no formato texto separado por tabulações. Os arquivos foram submetidos à análise pelo programa T-REX (Culman et al., 2009), através do qual os picos foram filtrados por um critério estatístico de 1,5 desvios padrões. O mesmo programa foi utilizado para se alinharem os T-RFs, pela metodologia descrita por Smith *et al.* (60), utilizando-se um intervalo de confiança de 0,5 pb. Uma planilha contendo todos os T-RFs alinhados por amostra foi obtida para cada enzima (*HhaI*, *MspI* e *RsaI*). Estes arquivos foram utilizados no cálculo de matrizes de distância para cada enzima, pelo pacote Vegan de funções de ecologia (<http://cc.oulu.fi/~jarioksa/softhelp/vegan.html>), com base no índice de Bray-Curtis. As matrizes obtidas foram submetidas à análise estatística multivariada de componentes principais (PCA), com o programa PAST e análises de agrupamento, pelo método UPGMA, com o programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). As planilhas obtidas pelo programa T-REX foram transformadas em matrizes binárias, indicando a presença ou ausência (respectivamente, 1 ou 0) dos fragmentos. Para cada T-RF, foi aplicado Teste T de Student bicaudal com nível de significância $\alpha = 0,05$, para verificação de possíveis diferenças na prevalência de T-RFs individuais nas amostras de biofilme supra e subgengivais. A predição taxonômica de T-RFs foi realizada pelo programa TAP T-RFLP, utilizando-se o banco de dados TRFMA de sequências nucleotídicas de 16S rDNA de bactérias orais, com intervalo de erro de 1 pb.

5. RESULTADOS

Todas as amostras tiveram resultados positivos para bactérias, revelados pela PCR com os iniciadores universais para o gene de 16S rRNA 6-FAM-27F e 1492R. A análise revelou, ao todo, 67 T-RFs^(R) (média = 17,3), 61 T-RFs^(M) (média = 19,3) 19 T-RFs^(H) (média = 6,4) em 11 casos de doença periodontal. A soma de todos os T-RFs encontrados no universo amostral para as endonucleases *HhaI*, *MspI* e *RsaI* foi, respectivamente, 70, 385 e 363. A prevalência de T-RFs por paciente variou entre 7 a 23 para *HhaI* (média = 3,2), 8 a 31 para *MspI* (média = 17,5), 4 a 34 para *RsaI* (média = 16,5), apresentando uma média geral de 24,8 T-RFs por paciente. Uma grande variabilidade nos perfis de restrição foi observada, sendo que 51% a 63% dos T-RFs foram detectados em menos de 4 amostras. Mais detalhes sobre a prevalência de T-RF encontram-se presentes na Tabela 1.

Tabela 1. Prevalência de T-RFs em 11 pacientes portadores de doença periodontal, conforme endonuclease utilizada.

Paciente	Amostra	<i>HhaI</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	Média
EOS	1.	3	21	34	19,3
	2.	4	0	22	8,7
	Total	4	21	41	22,0
FAS	3.	0	31	17	16,0
	4.	2	27	24	17,7
	Total	2	35	25	20,7
IFR	5.	0	31	18	16,3
	6.	0	13	4	5,7
	Total	0	33	19	17,3
JJR	7.	5	19	0	8,0
	8.	8	28	21	19,0
	Total	8	33	21	20,7
LIMR	9.	0	13	11	8,0
	10.	0	23	7	10,0
	Total	0	24	12	12,0
MCFP	11.	0	10	26	12,0
	12.	0	12	4	5,3

	Total	0	17	26	14,3
NAFS	13.	13	13	10	12,0
	14.	10	8	14	10,7
	Total	15	15	19	16,3
RABB	15.	11	21	21	17,7
	16.	0	24	22	15,3
	Total	11	34	31	25,3
RVCM	17.	4	13	15	10,7
	18.	9	24	18	17,0
	Total	9	26	19	18,0
SAB	19.	0	0	24	8,0
	20.	1	28	28	19,0
	Total	1	28	41	23,3
SCB	21.	0	15	5	6,7
	22.	0	11	18	9,7
	Total	0	15	19	11,3
		50			
Total Geral			281	273	201,3
Média		6,1	33,5	31,6	23,7
T-RFs Únicos ¹		10	25	30	21,7
T-RFs Duplos ²		6	15	9	10,0

¹T-RFs exclusivos de um paciente

²T-RFs exclusivos de 2 pacientes

Os diferentes fragmentos de restrição terminal encontrados para as três enzimas foram submetidos ao Teste T, para comparação da prevalência de T-RFs entre as amostras supragengivais e subgengivais. Com base nos resultados, a diferença entre os T-RFs das amostras supragengivais e subgengivais não foi estatisticamente significativa para as enzimas *HhaI* e *MspI* (dados não exibidos).

Cabe ressaltar que os T-RFs^(R) 440 e 450 apresentaram diferenças estatisticamente significantes de prevalência nos sítios supra e subgengival, demonstrado pelo teste T ($p = 0,018$). Contudo, devido à ausência de fragmentos correspondentes no banco de dados utilizado, a predição taxonômica destes T-RFs não foi realizada. Tais T-RFs podem, portanto, representar táxons ainda não descritos ou não-cultivados.

A predição taxonômica de T-RFs *in silico* demonstrou a presença de gêneros bacterianos reconhecidamente periodontopatogênicos. De fato, para enzima de restrição *HhaI*, foram constatados os gêneros *Actinomyces*, *Desulfobulbus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacter* e *Sphingomonas*. Semelhantemente, para a enzima de restrição *MspI*, foram observados os gêneros *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacter*, entre outros gêneros, como *Butyrivibrio*, *Leptotrichia*, *Leptothrix*, *Selenomonas*, *Streptococcus* e *Treponema*. Mais informações sobre as correlações específicas entre os resultados do programa TAP-T-RFLP (utilizando-se o banco de dados TRFMA de bactérias orais) e os T-RFs encontrados estão disponíveis nas tabelas 2 e 3, respectivamente, para endonuclease *HhaI* e *MspI*. Na figura 1, encontra-se o gráfico que representa a prevalência de gêneros identificados com estas endonucleases.

Embora alguns gêneros tenham sido encontrados em todas as amostras avaliadas, a análise estatística multivariada pelo método PCA não demonstrou agrupamento de perfis T-RFLP, segundo paciente ou sítio amostral, para todas as enzimas utilizadas, conforme ilustram as figuras 2, 3 e 4.

De acordo com a análise de clusterização, pôde-se observar uma leve tendência de agrupamento das amostras supragengivais restritas por *MspI* (figura 6). Essa tendência, contudo, não foi corroborada pela análise com as outras enzimas de restrição (figuras 5 e 7).

Alguns T-RFs foram detectados em quantidades muito superiores nos experimentos com as três endonucleases. Dentre estes, os T-RFs 78, 79, 80, 99, 122, 123, 124, 166, 167 e 168 pb foram os mais comumente encontrados (Figuras 8, 9 e 10). A predição desses fragmentos para a enzima *MspI* foi: 80 pb, *Streptococcus*; 99 pb, *Prevotella*; 122 pb, *Leptotrichia*; 123 pb, *Treponema*; 124 pb, *Propionibacter* e 168 pb, *Actinomyces*. Ainda, que de forma aproximada, puderam ser acrescentados à predição: 166 pb, *Propionibacter* (tamanho original:

165 pb), e 167 pb, *Actinomyces* (tamanho original: 168 pb). Ainda por aproximação, a predição para a *HhaI* foi: 80 pb, *Sphingomonas* (tamanho original: 81 pb), e 99 pb, *Prevotella* (tamanho original: 101 pb).

Tabela 2. Espécies preditas *in silico* pelo programa TAP-T-RFLP e banco de dados de bactérias orais TRFMA, baseado no perfil de fragmentos obtidos com a enzima *HhaI*.

T-RF	Unidade Taxonômica Operacional
81	<i>Sphingomonas</i> sp. oral clone FI012 e FZ016.
82	<i>Prevotella</i> sp. oral clone GI030.
93	<i>Desulfobulbus</i> sp. oral clone CH031.
101	<i>Prevotella</i> sp. oral clones DA058, GI032, GU027, HF050, ID019, IK053, IK062, <i>Porphyromonas</i> sp. oral clone EP003.
189	<i>Eubacterium</i> sp. oral clones EH006 e GI038.
197	<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone CZ006.
208	<i>Propionibacter</i> sp. oral clone HE018.
210	<i>Actinomyces</i> sp. oral clone IO077.
211	<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone CY024.
213	<i>Actinomyces</i> sp. oral clone EP011.
363	<i>Haemophilus</i> sp. oral clone JM053.

Tabela 3. Espécies preditas *in silico* pelo programa TAP-T-RFLP e banco de dados de bactérias orais TRFMA, baseado no perfil de fragmentos obtidos com a enzima *MspI*.

T-RF	Unidade Taxonômica Operacional
82	<i>Streptococcus</i> sp. oral clone GM006.
84	<i>Eubacterium</i> sp. oral clone JN088, <i>Streptococcus</i> sp. oral strain H3-M2.
91	<i>Prevotella</i> sp. oral clone FL019.
96	<i>Prevotella</i> sp. oral clones FW035, GI032, GU027, HF050, ID019, IK053, IK062 e DA058, <i>Porphyromonas</i> sp. oral clone EP003.
98	<i>Prevotella</i> sp. oral clones FU048 e GI030.
122	<i>Leptotrichia</i> sp. oral clone IK040.
123	<i>Treponema</i> Group 6 sp. oral clone IL034.
124	<i>Propionibacter</i> sp. oral clone HE018.
141	<i>Leptothrix</i> sp. oral clones AV011a e AW043.
144	<i>Actinomyces</i> sp. oral clone CT068.
164	<i>Actinomyces</i> sp. oral strain Hal-1065, <i>Leptotrichia</i> sp. oral clone EI022.
165	<i>Propionibacterium</i> acnes KPA171202.
168	<i>Actinomyces</i> sp. oral clone IO076.
169	<i>Eubacterium</i> sp. oral clone JH012.
174	<i>Leptotrichia</i> sp. oral clone HE012, <i>Selenomonas</i> sp. oral clone IQ048.
186	<i>Leptotrichia</i> sp. oral clone DA069.
192	<i>Eubacterium</i> sp. oral clone JI012.
281	<i>Fusobacterium</i> sp. oral clone CY024.
294	<i>Selenomonas</i> sp. oral clone JI021, <i>Eubacterium</i> sp. oral clone DA014, <i>Butyrivibrio</i> sp. oral clone DA074.
296	<i>Actinomyces</i> sp. oral clone IO077, <i>Eubacterium</i> sp. oral clone IR009.
301	<i>Actinomyces</i> sp. oral clone JA063, <i>Selenomonas</i> sp. oral clones CS002, EW084 e IK004.
484	<i>Eubacterium</i> sp. oral clone DO008.
496	<i>Haemophilus</i> sp. oral clones BJ095 e BJ021.

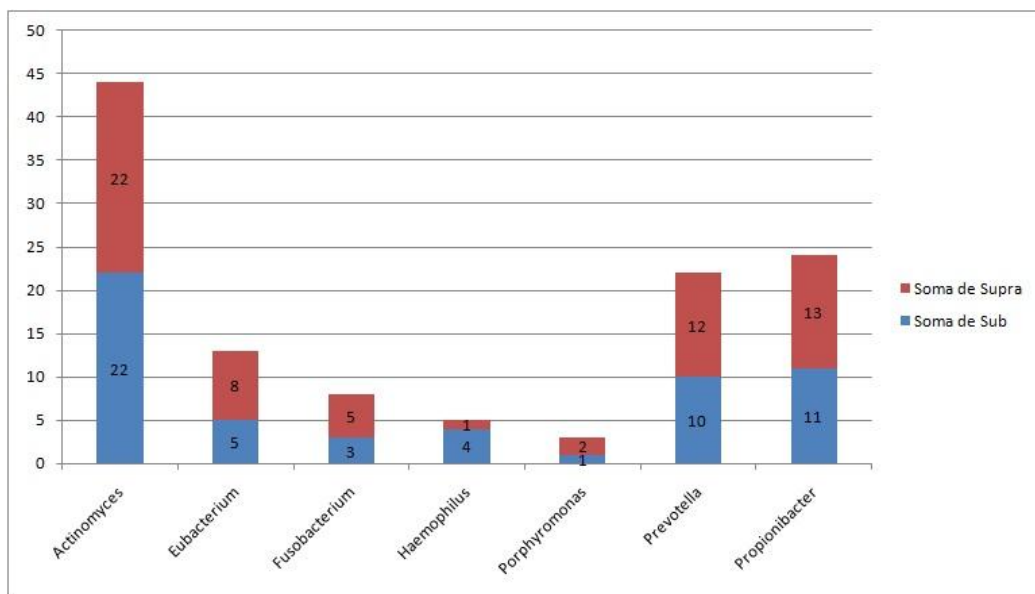


Figura 1. Prevalência dos principais gêneros encontrados em 11 casos de periodontite, utilizando-se as enzimas *HhaI* e *MspI*.

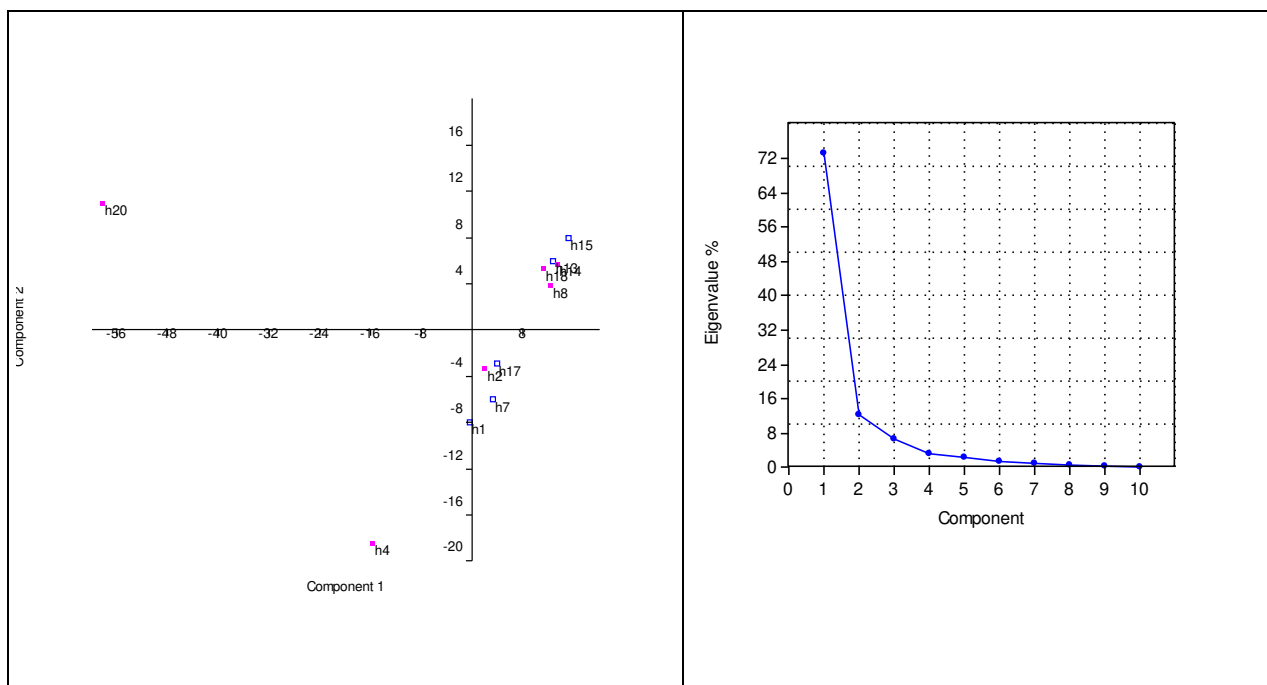


Figura 2. Resultados da análise de componentes principais (PCA) dos perfis T-RFLP obtidos com a endonuclease *HhaI*. Amostras supragengivais em azul, subgengivais em rosa.

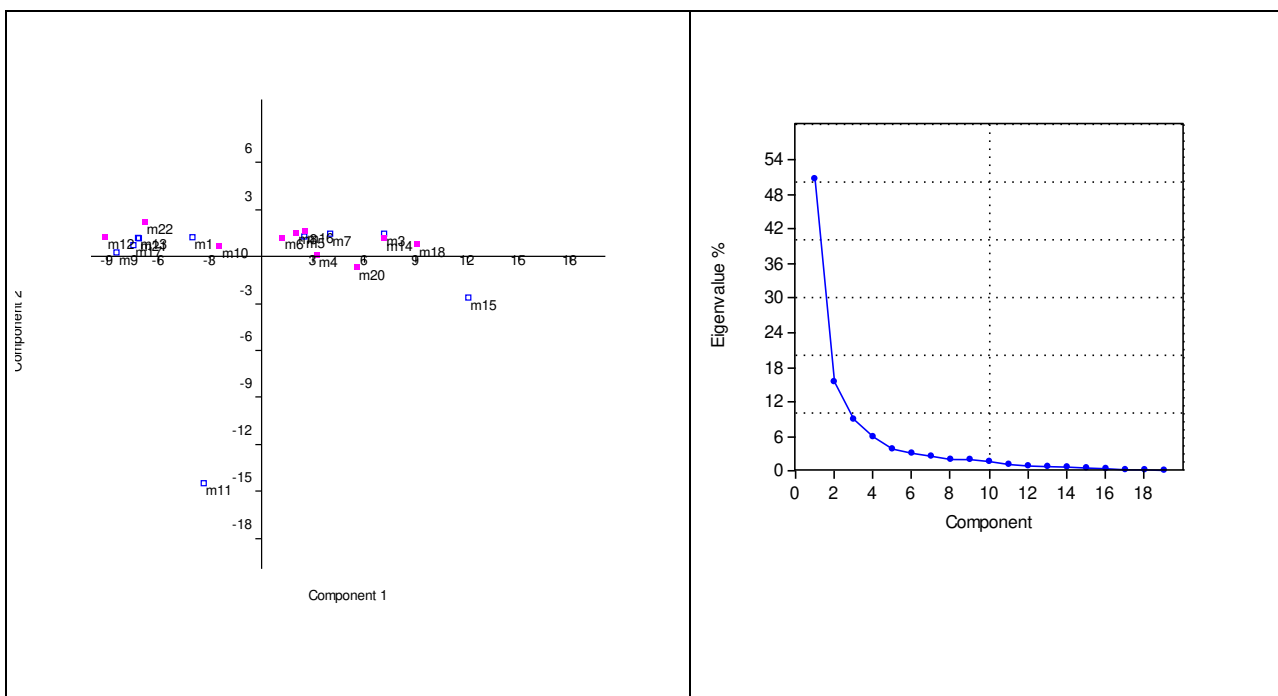


Figura 3. Resultados da análise de componentes principais (PCA) dos perfis T-RFLP obtidos com a endonuclease *MspI*. Amostras supragengivais em azul, subgingivais em rosa.

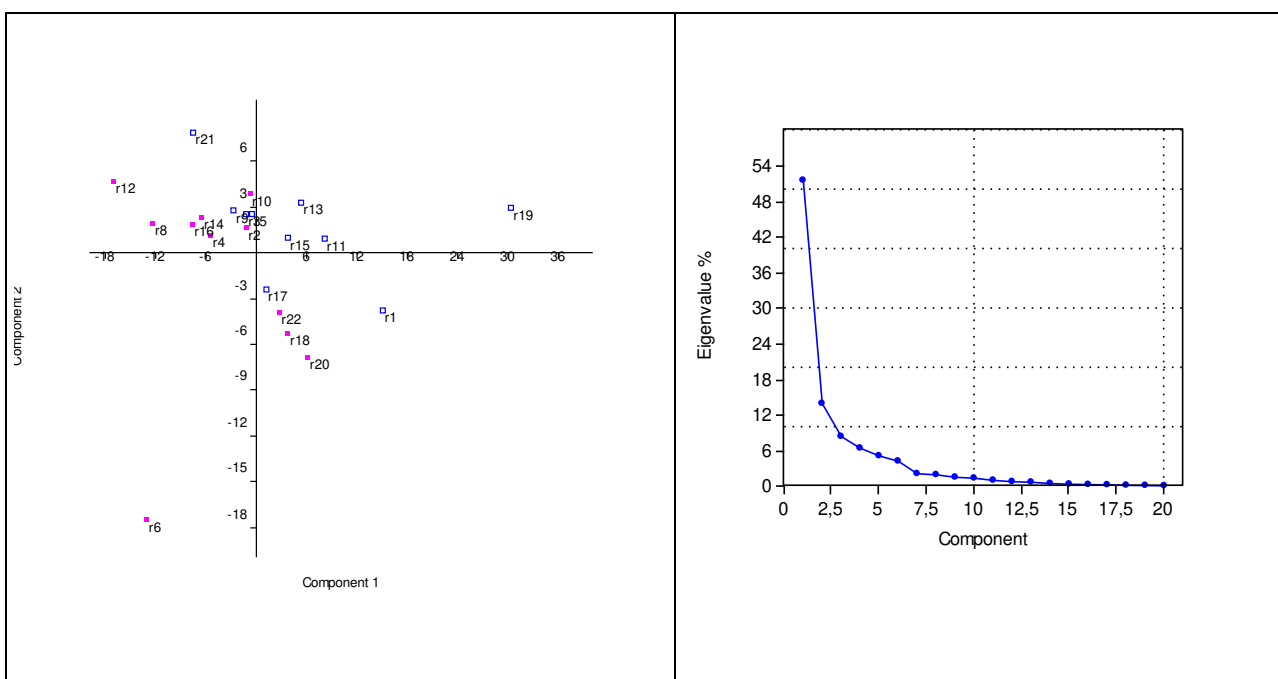


Figura 4. Resultados da análise de componentes principais (PCA) dos perfis T-RFLP obtidos com a endonuclease *RsaI*. Amostras supragengivais em azul, subgingivais em rosa.

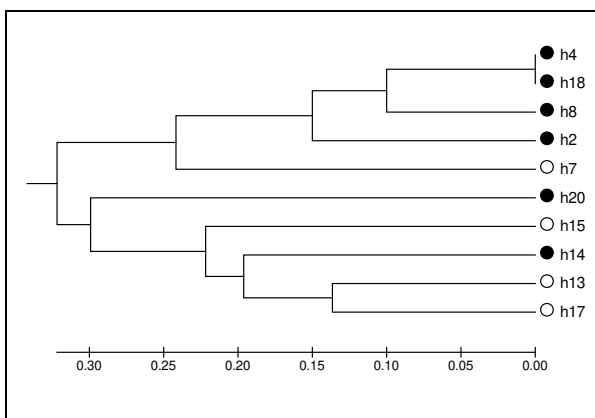


Figura 5. Dendrograma UPGMA dos perfis T-RFLP obtidos com a enzima HhaI, utilizando-se o a distância de Bray-Curtis. Amostras supragengivais representadas por círculos brancos e subgengivais, por círculos pretos.

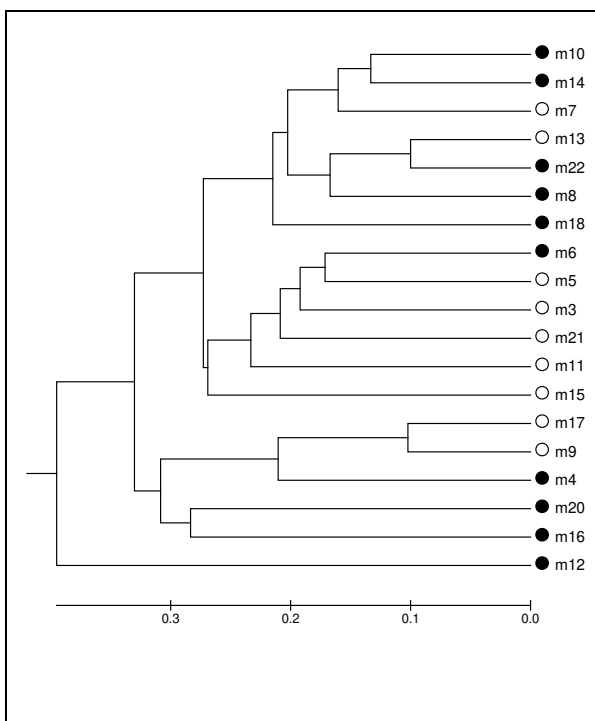


Figura 6. Dendrograma UPGMA dos perfis T-RFLP obtidos com a enzima *MspI*, utilizando-se o a distância de Bray-Curtis. Amostras supragengivais representadas por círculos brancos e subgengivais, por círculos pretos.

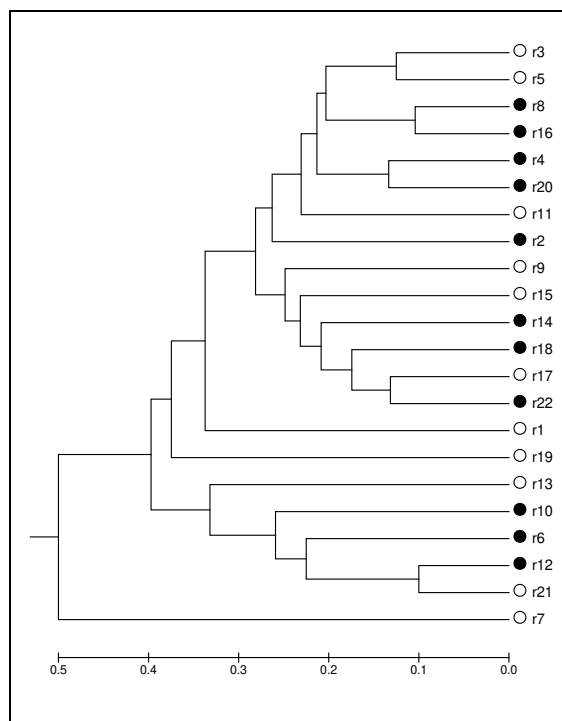


Figura 7. Dendrograma UPGMA dos perfis T-RFLP obtidos com a enzima *RsaI*, utilizando-se o a distância de Bray-Curtis. Amostras supragengivais representadas por círculos brancos e subgengivais, por círculos pretos.

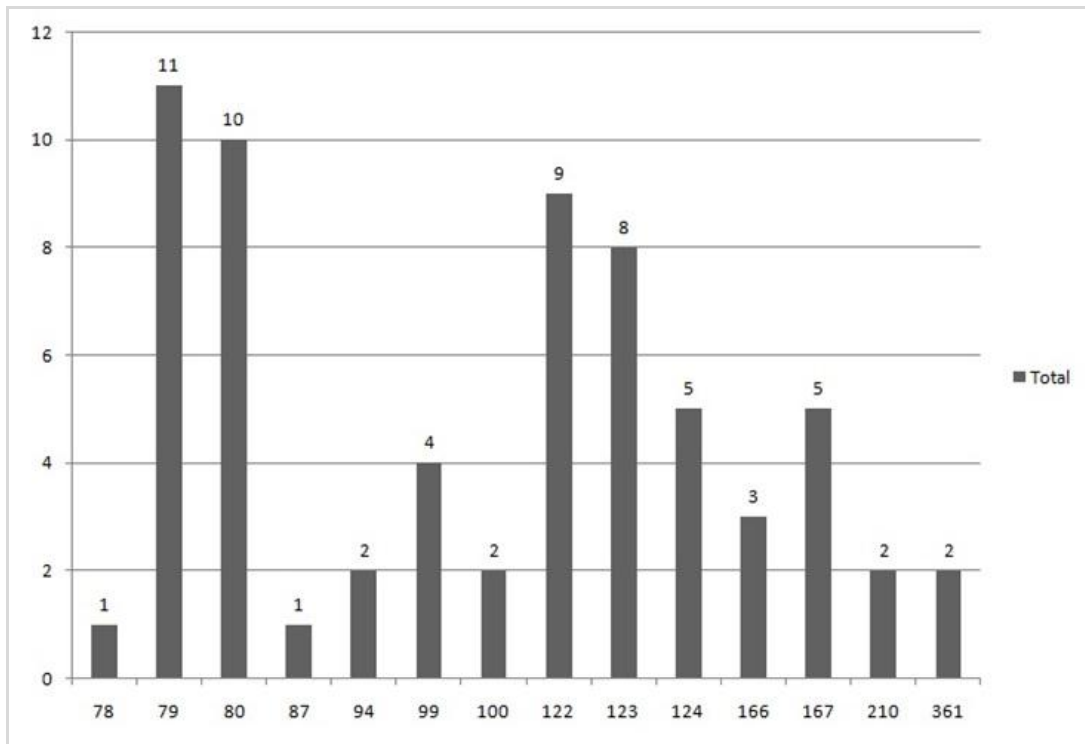


Figura 8. Prevalência dos T-RFs mais abundantes em 22 amostras de biofilme, conforme análise com a endonuclease tetramérica *HhaI*.

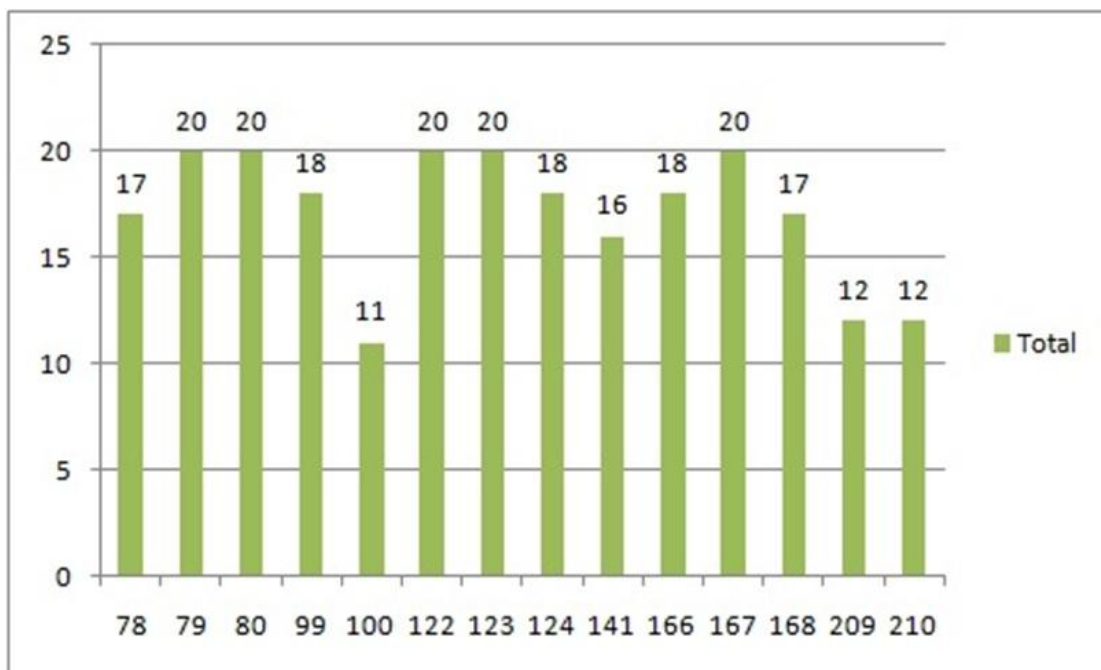


Figura 9. Prevalência dos T-RFs mais abundantes em 22 amostras de biofilme, conforme análise com a endonuclease tetramérica *MspI*.

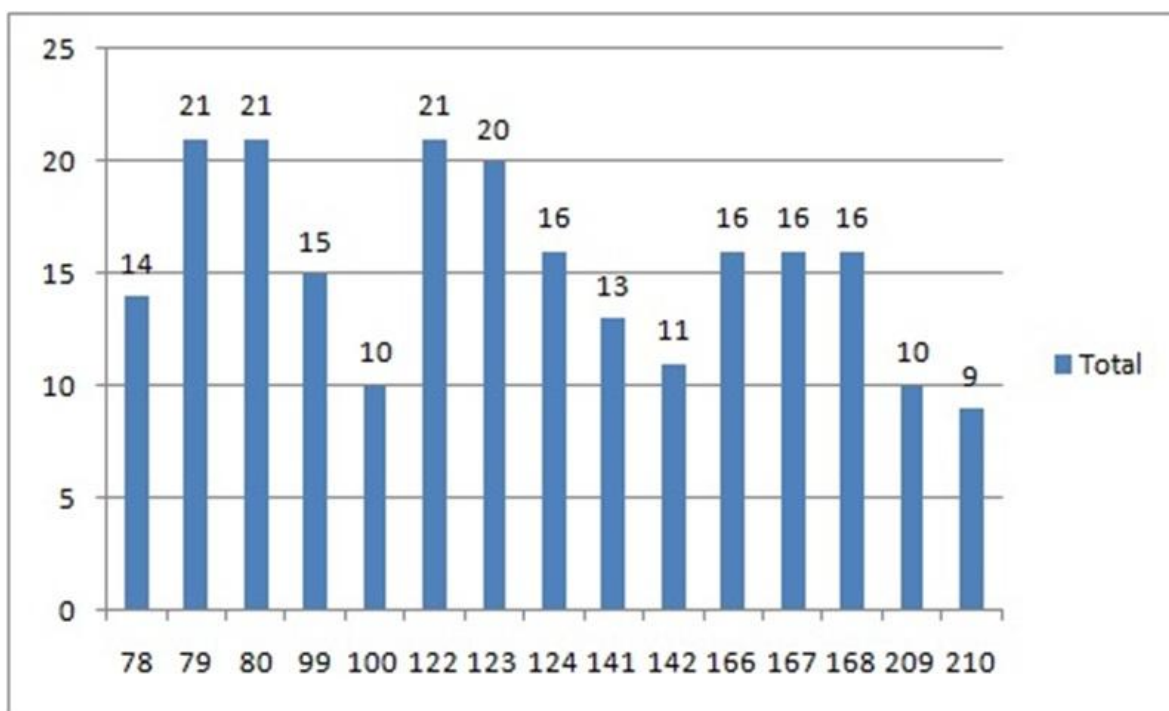


Figura 10. Prevalência dos T-RFs mais abundantes em 22 amostras de biofilme, conforme análise com a endonuclease tetramérica *RsaI*.

6. DISCUSSÃO

A detecção molecular de bactérias com base na utilização dos iniciadores universais 27F e 1492R foi empregada em estudos similares, demonstrando que esse conjunto de marcadores é confiável na caracterização de comunidades bacterianas complexas, principalmente por ser capaz de amplificar 16S rDNA de diversos grupos bacterianos (Paster *et al.*, 2001; Munson *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2003a). Ademais, o uso destes mesmos marcadores em T-RFLP, quando associados às enzimas *HhaI* e *MspI*, possui poder discriminatório suficiente para a predição taxonômica da maioria dos gêneros encontrados na cavidade oral (Sakamoto *et al.*, 2003a; Saito *et al.*, 2009). A técnica de T-RFLP tem sido empregada, com sucesso, na análise da comunidade bacteriana salivar e de biofilme subgengival, provenientes de pacientes com comprometimento periodontal, pacientes tratados e saudáveis, possibilitando a comparação da estrutura da comunidade bacteriana do biofilme em diferentes condições (Sakamoto *et al.*, 2003a, 2004).

Dentre os gêneros comumente encontrados em pesquisas de detecção molecular de patógenos orais, destacam-se representantes dos gêneros *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Selenomonas*, *Tannerella*, *Treponema* e *Veillonella*. Muitos destes microrganismos já foram positivamente associados a quadros específicos de doença, participando também da organização de complexos microbianos relacionados ao grau de gravidade da periodontite (Socransky *et al.*, 1998; Paster *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2003, 2004; Jekinson & Lamont, 2005; Takeshita *et al.*, 2007; Haffajee *et al.*, 2008). Contudo, no presente estudo, não foram identificados os gêneros *Aggregatibacter*, *Neisseria*, *Tannerella* e *Veillonella*. Como possíveis causas para a ausência destes gêneros, podemos citar a geração de fragmentos de restrição fora da faixa

de análise empregada no estudo, que foi de 30 a 500 pb, bem como uma baixa especificidade dos iniciadores utilizados na PCR 16S rDNA para esses gêneros.

Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas na composição bacteriana do biofilme supra e subgengival em 11 pacientes portadores de periodontite. De fato, a ausência de diferenças estatisticamente significativas na composição bacteriana de amostras de biofilme supragengival e subgengival já foi anteriormente relatada. De acordo com Haffajee *et al.* (2008), existem complexos bacterianos específicos na placa supragengival que têm similaridade com aqueles encontrados na placa subgengival, com algumas pequenas diferenças. Outros autores sugerem que a formação do biofilme subgengival está diretamente relacionada ao biofilme supragengival, com variações nas respectivas composições microbianas, originadas pelas diferentes características desses dois microambientes (Kumar *et al.*, 2005; Quirynen *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos também já relataram a detecção de espécies tidas como subgengivais colonizando sítios supragengivais (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000).

Outros estudos apontam o desequilíbrio entre saúde e doença como principal causa de diferenças mais evidentes entre tipos diversos de biofilme. As espécies predominantes em sítios orais associados à doença são diferentes daquelas encontradas em sítios saudáveis, embora espécies patogênicas possam ser encontradas, em quantidades mais baixas, nos sítios saudáveis. As espécies do gênero *Actinomyces*, por exemplo, são as mais dominantes no biofilme supra e subgengival, tanto nas amostras de pacientes saudáveis como doentes. (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2006).

A similaridade encontrada entre em estados de saúde diversos, ou até mesmo divergentes, deve ser considerada e pode ser justificada, pelo menos parcialmente, pelo processo dinâmico de constante mudança na composição do biofilme bucal. Esse processo está sujeito a uma hierarquia de colonização previamente descrita por outros autores. De fato, o processo de sucessão

bacteriana tem início com a colonização da película adquirida por gêneros denominados colonizadores iniciais, como *Streptococcus* spp. A colonização subsequente por bactérias como *Actinomyces*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Fusobacterium* e *Treponema* pode levar ao desenvolvimento de um quadro patológico, ou ao reinício deste ciclo (Socransky *et al.*, 1998; Paster *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2003a, 2004; Jekinson & Lamont, 2005; 19, Takeshita *et al.*, 2007; Haffajee *et al.*, 2008).

Algumas espécies representam bem essa dicotomia. Apesar de presentes em sítios orais compatíveis com saúde, sua presença está fortemente associada a quadros de doença periodontal como, por exemplo: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola* (Löe, 1981; Paster *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2003^a, 2004; Jekinson & Lamont, 2005; 19, Takeshita *et al.*, 2007; Haffajee *et al.*, 2008). O biofilme bucal é uma complexa estrutura microscópica que varia de forma inter e intrapessoal. É provável que, em diferentes regiões da cavidade oral, ou, até mesmo, em outro sítio ou superfície de um mesmo dente, possam existir formas distintas de biofilme, em diferentes estágios de sucessão microbiana, o que acrescenta fator complicador na análise de dados.

Através de técnicas como T-RFLP, tem se tornando relativamente comum detectar a presença de gêneros fastidiosos que, de outra forma não poderiam ser identificados, por não serem passíveis de cultivo pelas técnicas atualmente disponíveis. Nesse contexto, bactérias do gênero *Selenomonas*, anteriormente relatadas como raras, ou muitas vezes não-detectadas, vêm sendo gradativamente identificadas em estudos baseados em técnicas moleculares em casos de doença, como a periodontite (Socransky *et al.*, 1998; Paster *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005; Teles *et al.*, 2011). Nesse trabalho, alguns representantes de *Selenomonas* não-cultivados foram detectados, os quais já foram correlacionados a quadros de cárie e doença periodontal (Kumar *et al.*, 2005; Teles *et al.*, 2011).

O filo Proteobacteria é constituído, predominantemente, por espécies aeróbias Gram-negativas, sendo o maior grupo de bactérias existente. Dentre as classes pertencentes a este filo, destacam-se Betaproteobacteria (aeróbias ou aeróbias facultativas) e Deltaproteobacteria (redutoras de sulfato). Em nosso estudo, foram detectados representantes de ambas as subdivisões: Deltaproteobacteria (*Desulfobulbus* sp. oral clone CH031) e Betaproteobacteria (*Leptothrix* sp. oral clones AV011a e AW043). Tais gêneros têm sido identificadas no fundo de bolsa e encontrados em diversos tipos clínicos de doença periodontal (Paster *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005; Teles *et al.*, 2011).

O filo Bacteroidetes de bactérias anaeróbias Gram-negativas contém importantes representantes associados à doença periodontal, incluindo as espécies pigmentadas-negras (Paster *et al.*, 2001). No presente estudo, os seguintes gêneros foram encontrados: *Porphyromonas* sp. oral clone EP003, *Porphyromonas*-like sp. oral clone DA064 e *Prevotella* sp. oral clones DA058, FL019, FU048, FW035, GI030, GI032, GU027, HF050, ID019, IK053 e IK062. A grande maioria desses gêneros foi originalmente identificada em um estudo baseado no sequenciamento de bibliotecas clonais de 16S rDNA em biofilme dentário periodontopatogênico de pacientes portadores de periodontite ulcero-necrosante aguda, refratária, crônica e associada à aids (Paster *et al.*, 2001).

As espécies do filo Spirochaetes tem sido frequentemente detectadas em bolsas periodontais, sendo representadas por bactérias espiraladas, Gram-negativos e, em sua maioria, anaeróbios. As bactérias deste filo são, geralmente, altamente fastidiosas, requerendo condições de cultivo muito específicas. Assim, sua detecção por técnicas de cultivo laboratorial é bastante dificultada. Por outro lado, o sequenciamento de bibliotecas clonais 16S rDNA tem demonstrado uma alta prevalência de *Treponema* spp. na cavidade oral (Paster *et al.*, 2001). Contudo, no presente estudo, somente um representante do gênero pôde ser detectado. Sugere-se que o uso de iniciadores gênero-específicos possa aprimorar a detecção de espécies deste gênero (Dewhirst *et al.*, 2000).

Outros gêneros previamente relatados em amostras salivares e associados a infecções orais puderam ser detectados. Dentre eles, destacam-se *Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Corallococcus*, *Eubacterium*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Propionibacter* e *Selenomonas* (Takeshita *et al.*, 2007; Funke *et al.*, 2010; Nakano *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010). Os gêneros *Actinomyces* e *Eubacterium*, por sua vez, já foram previamente associados a infecções endodônticas (Munson *et al.*, 2002; Hommez *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2009), embora sejam bastante prevalentes no biofilme subgengival de indivíduos portadores de doença periodontal (Paster *et al.*, 2001).

Alguns gêneros menos comuns, como *Leptothrix* e *Sphingomonas*, foram previamente reportadas em amostras de líquido sinovial de pacientes com desordem temporomandibular (Sun *et al.*, 2008) e também puderam ser identificados nesse estudo, bem como representantes de *Bifidibacterium* e *Selenomonas*, habitantes comuns de lesões de cárie (Kanasi *et al.*, 2010).

A ausência ou baixa incidência de gêneros/espécies tidos como habitantes comuns da cavidade oral, pode ser explicada pela variação no tamanho dos T-RFs. De fato, uma dificuldade comumente associada na identificação das espécies por T-RFLP envolve erros no dimensionamento dos fragmentos. Isso pode ocorrer devido a uma discrepância entre o tamanho do fragmento observado após eletroforese e o tamanho calculado a partir da composição de nucleotídeos do DNA referência (Kaplan *et al.*, 2001, 2003; Mars T *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2003a). Assim, tem-se sugerido formas alternativas de análise, para se reduzirem os erros de dimensionamento e se alcançar o pleno potencial da técnica de T-RFLP (Takeshita *et al.*, 2007).

Durante a eletroforese capilar, a mobilidade dos oligonucleotídeo depende principalmente de sua massa. No entanto, outros fatores também podem a migração de fragmentos de DNA em gel ou polímero em capilar. De fato, fragmentos de tamanho menores do que 50 pb podem não ser detectados adequadamente, enquanto que os maiores que 500 pb possuem interferência

prejudicada por diminuição da precisão na eletroforese. Ainda, artefatos de PCR podem produzir dados anômalos, como dímeros de iniciadores e ruídos de fluorescência (Engebretson *et al.*, 2003; Marsh P *et al.*, 2003).

Para minimizar a variabilidade e obter melhor reprodutibilidade, um padrão interno pode ser incluído na mesma reação. Marsh T (2005) demonstrou que diferenças químicas nos corantes fluorescentes utilizados para marcar fragmentos também podem interferir na mobilidade dos mesmos, enquanto que Kaplan e Kitts (2003) indicaram que as diferenças de sequência poderiam resultar em variações na mobilidade eletroforética. Como forma de solucionar este problema, Takeshita (Takeshita *et al.*, 2007) utilizou um padrão de massa molecular derivado da restrição do gene 16S rRNA. Utilizando-se dessa nova padronização, foi possível obter uma drástica diminuição da média de erros de predição por tamanho de T-RFs.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo permitem concluir que a comunidade bacteriana do biofilme dentário associado à periodontite é bastante variável entre indivíduos, embora possua alguns gêneros predominantes. Dentre elas, destacam-se *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Propionibacter*.

A existência de fragmentos terminais de restrição sem correspondência com o banco de dados de bactérias orais indica que uma parcela significativa de táxons ainda necessita de caracterização futura por técnicas moleculares.

O estudo demonstrou que a técnica de T-RFLP pode ser útil para se acessar a diversidade bacteriana da cavidade oral, ao permitir uma análise rápida e abrangente da estrutura de comunidades bacterianas de microambientes distintos, em indivíduos portadores de periodontite.

8. REFERÊNCIAS*

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5721-5732.
2. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz Ö. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 2009; 28 (8): 405-411.
3. Bordanave S, Goñi-Urriza MS, Caumette P, Duran R. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 17-25.
4. Bruce KD, Hughes MR. Terminal restriction fragment length polymorphism monitoring of genes amplified directly from bacterial communities in soils and sediments. *Mol Biotechnol.* 2000; 16: 261-269.
5. Chin KJ, Lukow T, Conrad R. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65: 2341-2349.
6. Colombo AP, Boches Sk, Haffajee AD, Socransky SS, Paster BJ, *et al.* Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal healthy using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol.* 2009; 80 (9): 1421-1432.
7. Culman SW, Bukowski R, Gauch HG, Cadillo-Quiroz H, Buckley DH. T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics.* 2009; 10: 171.
8. Dewhirst FE, Tamer MA, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Boches SK, Galvin JL, Paster BJ. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15: 196-202.
9. Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 190-197.
10. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990; 12: 13-15.

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

11. Funke G, Englert R, Frodl R, Bernard KA, Stenger S. *Actinomyces hominis* sp. Nov, isolated from a wound swab. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010; 60 (pt7): 1678-1681.
12. Fullmer SC, Preshaw PM, Heasman PA, Kumar PS. Smoking cessation alters subgingival microbial recolonization. *J Dent Res*. 2009; 88: 524-528.
13. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23 (3): 196-205.
14. Haake SK, Newman MG, Nisengard RJ, Sanz M. *Microbiologia Periodontal*. In: Carranza, FA, Newman, MG e Takei, HH. *Carranza Periodontia Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koohan. 9º ed, 2004; (6): 86-100.
15. Hall V. *Actinomyces* – gathering evidence of human colonization and infection. *Anaerobe*. 2008; 14 (1): 1-7.
16. Hommez GM, Verhelst R, Claeys G, Vaneechoutte M, De Moor RJ. Investigation of the effect of the coronal restoration quality on the composition of the root canal microflora in teeth with apical periodontitis by means of T-RFLP analysis. *Int Endod J*. 2004; 37: 819–827.
17. Hommez GM, Verhelst R, Vaneechoutte M, Claeys G, De Moor RJ. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the microflora in necrotic teeth of patients irradiated in the head and neck region. *J Endod*. 2008; 34: 1048-1051.
18. Jekinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005; 13: 589-595.
19. Kanasi E, Dewhirst FE, Chalmers NI, Kent R Jr, Moore A *et al*. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res*. 2010; 44 (5): 485-497.
20. Kaplan CW, Astaire JC, Sanders ME, Reddy BS, Kitts CL. 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67: 1935–1939.
21. Kaplan CW, Kitts CL. Variation between observed and true Terminal Restriction Fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J Microbiol Methods* 2003; 54: 121–125.
22. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Dewhirst FE *et al*. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 558–563.

23. Kent AD, Smith DJ, Benson BJ, Triplett EW. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 6768–6776.
24. Kolenbrander PE *et al.* Bacterial interactions and sucessions during plague development. *Periodontol 2000.* 2006; 42: 47-79.
25. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (8): 3944-3955.
26. Lang NP, Mombelli A, Attström R. Placa e Cálculo Dentais. In: Lindhe J, Arning T, Lang NP. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral.* 3° Ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 3°ed, 1997; cap.3: 66-91.
27. Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man: a light and electrin microscopic study. *J Periodontol.* 1976; 47 (1): 1-18.
28. Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63: 4516–4522.
29. Løe H. The role of bacteria in periodontal diseases. *Bull world Health Organ.* 1981; 59 (6): 821-825.
30. Luckey JA, Smith LM. A model for the mobility of single-stranded DNA in capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 1993; 14: 492–501.
31. Lueders T, Friedrich MW. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methagenomic purê cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69 (1): 320-326.
32. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis.* 2003; 9 suppl 1: 16-22.
33. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004; 38 (3): 204-211.
34. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006; 6 (Suppl 1): S14.
35. Marsh TL. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol.* 1999; 2: 323–327.

36. Marsh TL, Saxman P, Cole J, Tiedje J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 3616–3620.
37. Marsh TL. Culture-independent microbial community analysis with terminal restriction fragment length polymorphism. *Methods Enzymol.* 2005; 397: 308–329.
38. Matsumoto M, Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y. Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J Microbiol Methods.* 2005; 61: 305–319.
39. Moyer CL, Dobbs FC, Karl DM. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16s rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60: 871-879.
40. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002; 81: 761-6.
41. Nagashima K, Hisada T, Sato M, Mochizuki J. Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 1251-62.
42. Nakano Y, Takehsita T, Yamashite Y. TRFMA: a web-based tool for terminal restriction fragment length polymorphism analysis based on molecular weight. *Bioinformatics.* 2006; 22 (4):1788-1789.
43. Nakano Y, Takeshita T, Yasui M, Yamashita Y. Prediction of plausible bacterial composition based on terminal restriction fragment length polymorphism using a Monte Carlo method. *Microb Ecol.* 2010; 60: 364-372.
44. Nyman JL, Marsh TL, Ginder-Vogel MA, Gentile M, Fendorf S, Criddle C. Heterogeneous response to biostimulation for U (VI) reduction in replicated sediment microcosms. *Biodegradation.* 2006; 17: 303–316.
45. Palmer Jr RJ. Supragingival and subgingival plaque: paradigm biofilms. *Compend Contin Educ Dent.* 2010; 31 (2): 104-106.
46. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriaol.* 2001; 183: 3770-3783.
47. Pennisi E. A mouthful of microbes. *Science.* 2005; 307 (5717):1899-1901.

48. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Haffajee A, *et al.* Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17 (1): 25-37.
49. Rogers GB, Carroll MP, Serisier DJ, Hockey PM, Kehagia *et al.* Bacterial activity in cystic fibrosis lung infections. *Respir Res.* 2005; 6: 49.
50. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbs Infect.* 2000; 2 (13): 1599-1607.
51. Saito D, Marsh TL, Cannavan FS, Höfling JF, Gonçalves RB. Assessment of intraradicular bacterial composition by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24: 369-376.
52. Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 79–89.
53. Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and application for analysis of complex bifidobacterial communities. *Microbiol Immunol.* 2003; 47: 133-142.
54. Sakamoto M, Huang Y, Ohnishi M, Umeda M, Ishikawa I *et al.* Changes in microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *J Med Microbiol.* 2004; 53 (pt 6): 563-571.
55. Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 112–122.
56. Sardi JC, Duque C, Mariano FS, Peixoto IT, Höfling JF *et al.* *Candida* spp. In periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci.* 2010; 52 (2): 177-185.
57. Slots J. Herpesviral-bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007; 20 (3): 278-283.
58. Shin K, Yaegaki K, Murata T, li H, Tanaka T, *et al.* Effects of a composition containing lactoferrin and lactoperoxidase on oral malodor and salivary bacteria: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2010.
59. Smith CJ, Danilowicz BS, Clear AK, Costello FJ, Wilson B, Meijer WG. T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005; 54 :375-80.

60. Stoodley P *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002; 56: 187-209.
61. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25 (2): 134-144.
62. Socransky SS, Haffajee AD. Dental Biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002; 28: 12-55.
63. Sun W, Dong L, Kaneyama K, Takegami T, Segami N. Bacterial diversity in synovial fluids of patients with TMD determined by cloning and sequencing analysis of the 16S ribosomal RNA gene. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105 (5): 566-71.
64. Tal M. Periodontal disease and oral hygiene. Described by Antoni van Leeuwenhoek. *J Periodontol.* 1980;51 (11): 668-669.
65. Takeshita T, Nakano Y, Yamashita Y. Improved accuracy in terminal restriction fragment length polymorphism phylogenetic analysis using a novel internal standard definition. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 419-428.
66. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 24:1596-9.
67. Teles FR, Teles RP, Siegelin Y, Paster B, Haffajee AD, Socransky SS. RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) for the enumeration of uncultivated bacterial species in subgingival biofilms. *Mol Oral Microbiol.* 2011; doi: 10.1093/molbev/msr121.
68. van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk Lekkerkerk-v. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond).* 1971; 69 (3): 405-411.
69. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Hartz HP. T-RFLP-based mcrA gene analysis of methanogenic archaea in association with oral infections and evidence of a novel methanobrevibacter phylotype. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24: 417-422.
70. Wang X, Wen X, Yan H, Ding K, Zhao F *et al.* Bacterial community dynamics in a functionally stable pilot-scale wastewater treatment plant. *Bioresour Technol.* 2011; 102: 2352-2357.
71. Wilderer PA & Charaklis WG. Structure and function of biofilms. In: Charaklis, WG & Wilderer, PA. Structure and function of biofilms. Chichester, UK: John Wiley. 1989: 5-17.

72. Ximenez-Fyvie LA, Haffejee AD, Socransky SS. Microbioal composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adults periodontitis. J Clin Periodontol 2000. 2000; 27: 722-732.

APÊNDICE 1

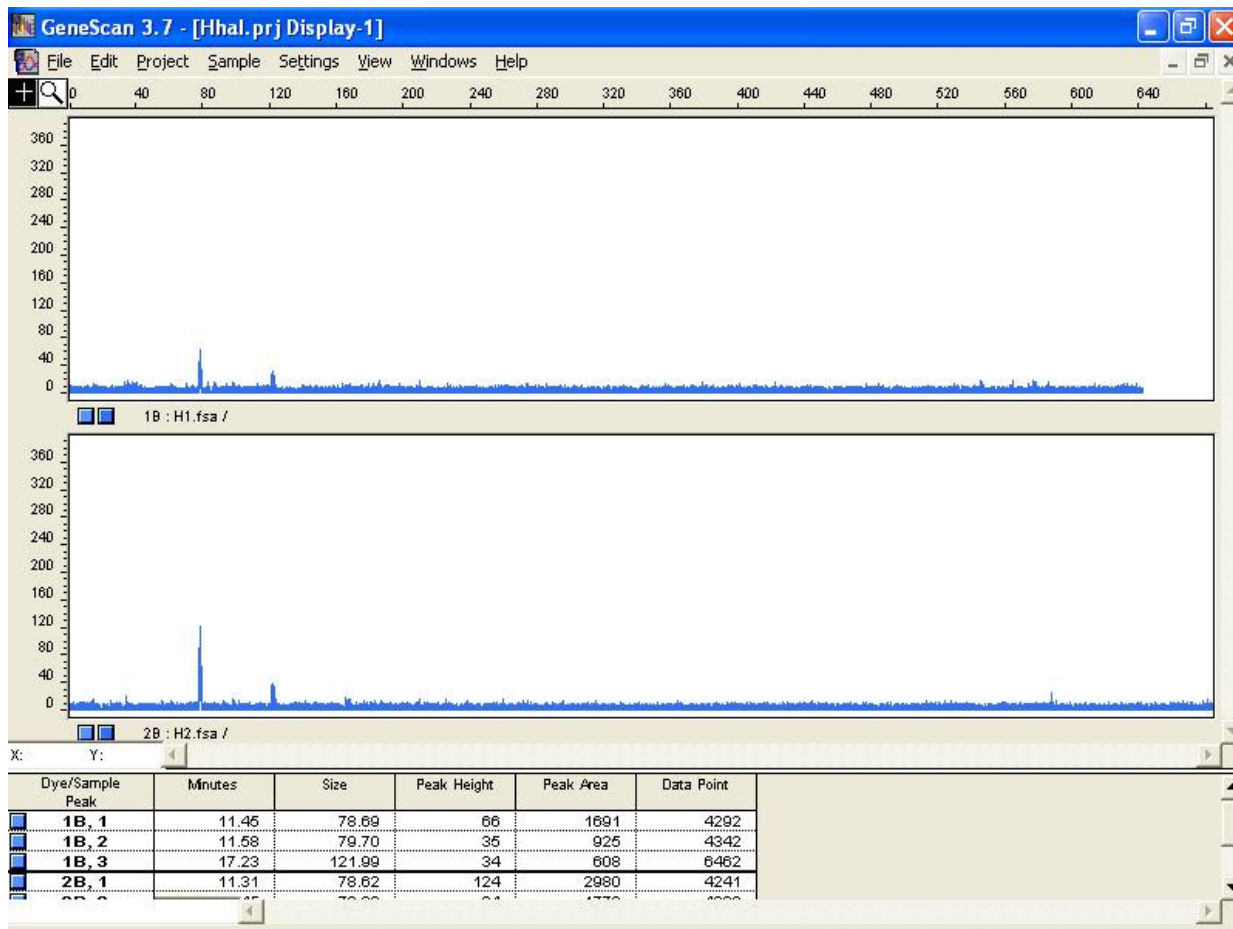


Figura 11. Eletroferogramas T-RFLP das amostras H1 e H2, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 2

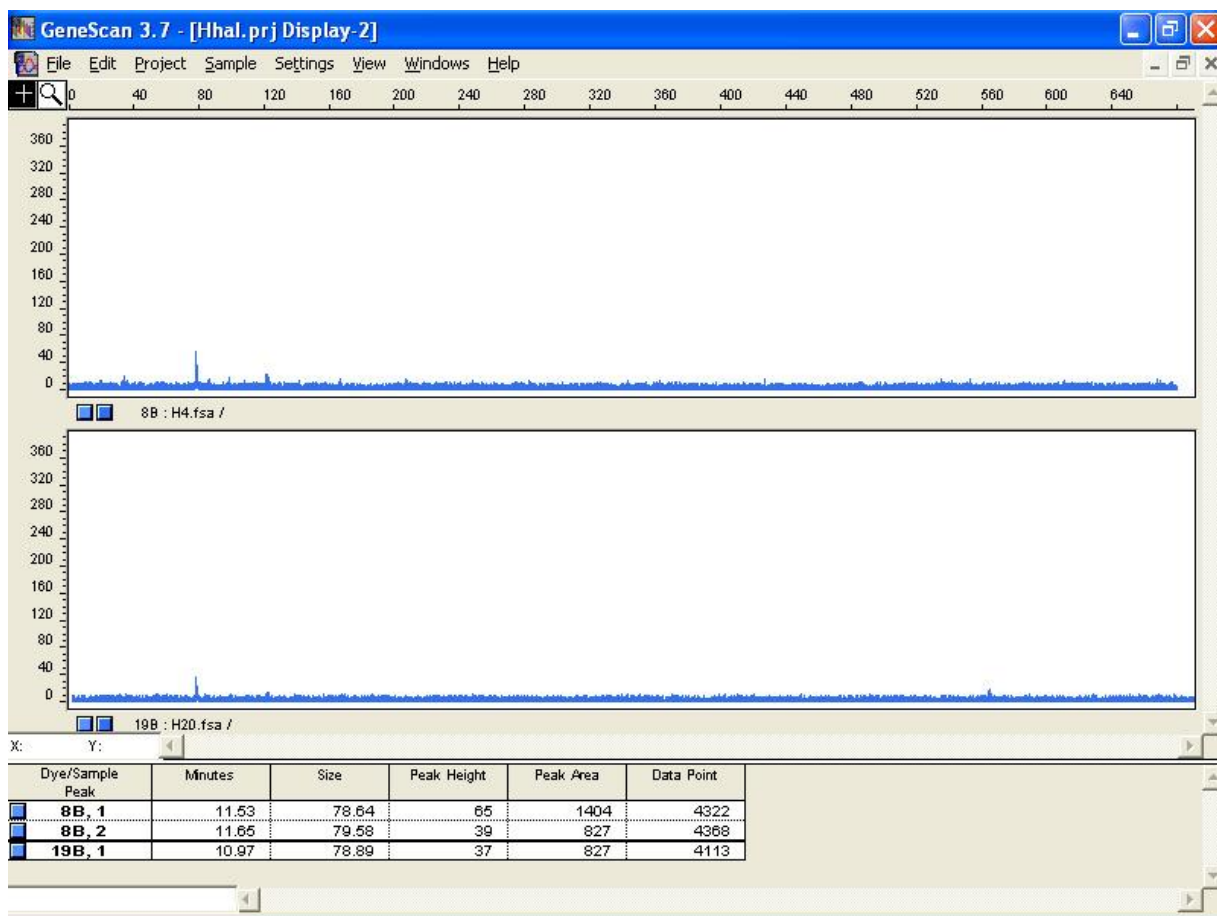


Figura 12. Eletroferogramas T-RFLP referentes às amostras H4 e H20, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 3

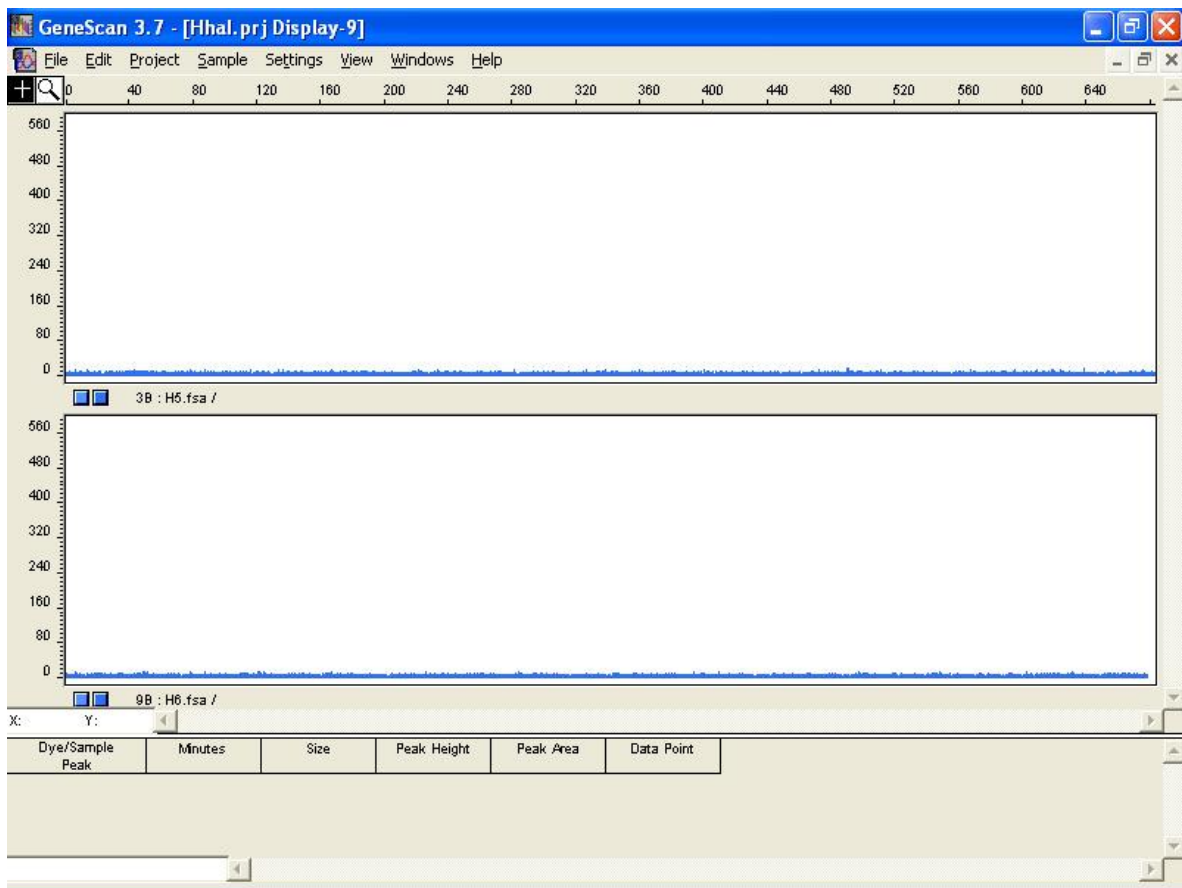


Figura 13. Eletroferogramas T-RFLP das amostras H5 e H6, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 4

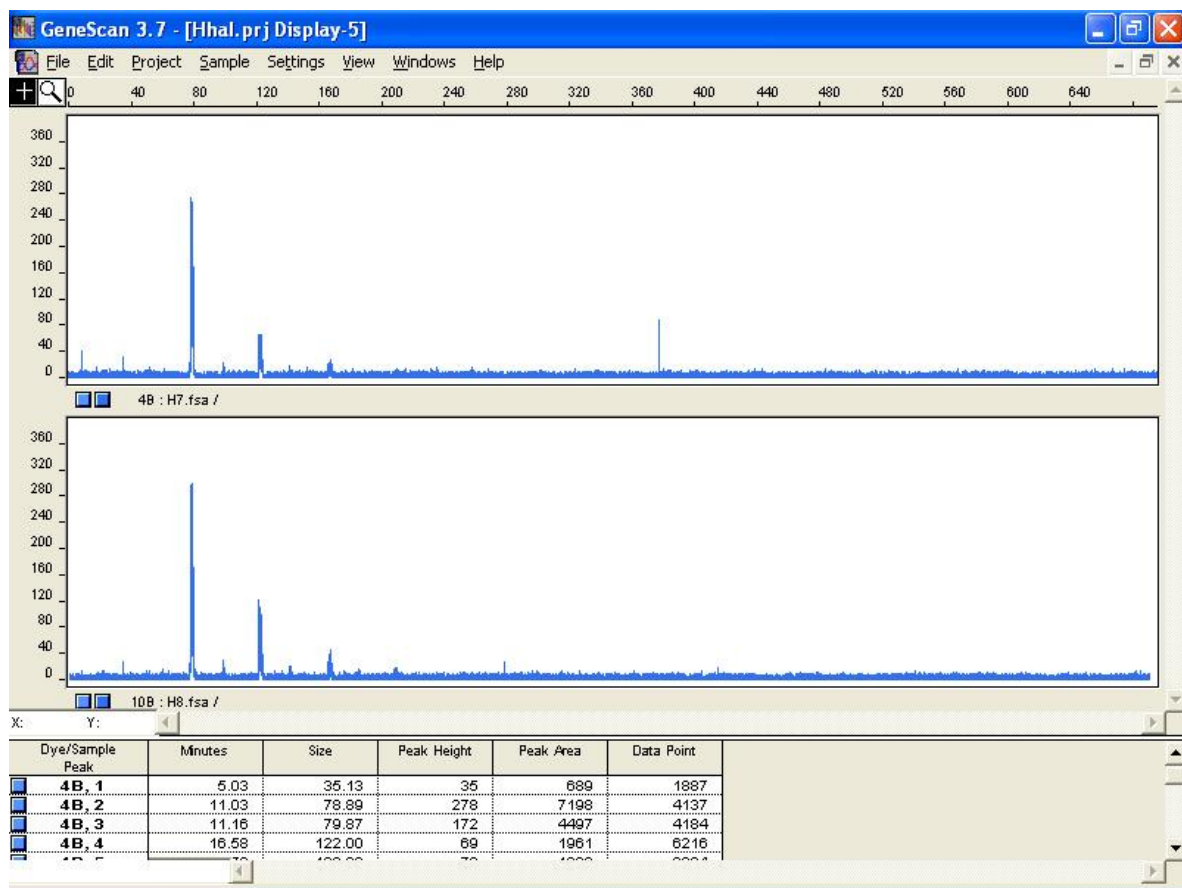


Figura 14. Eletroferogramas referentes às amostras H7 e H8, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 5

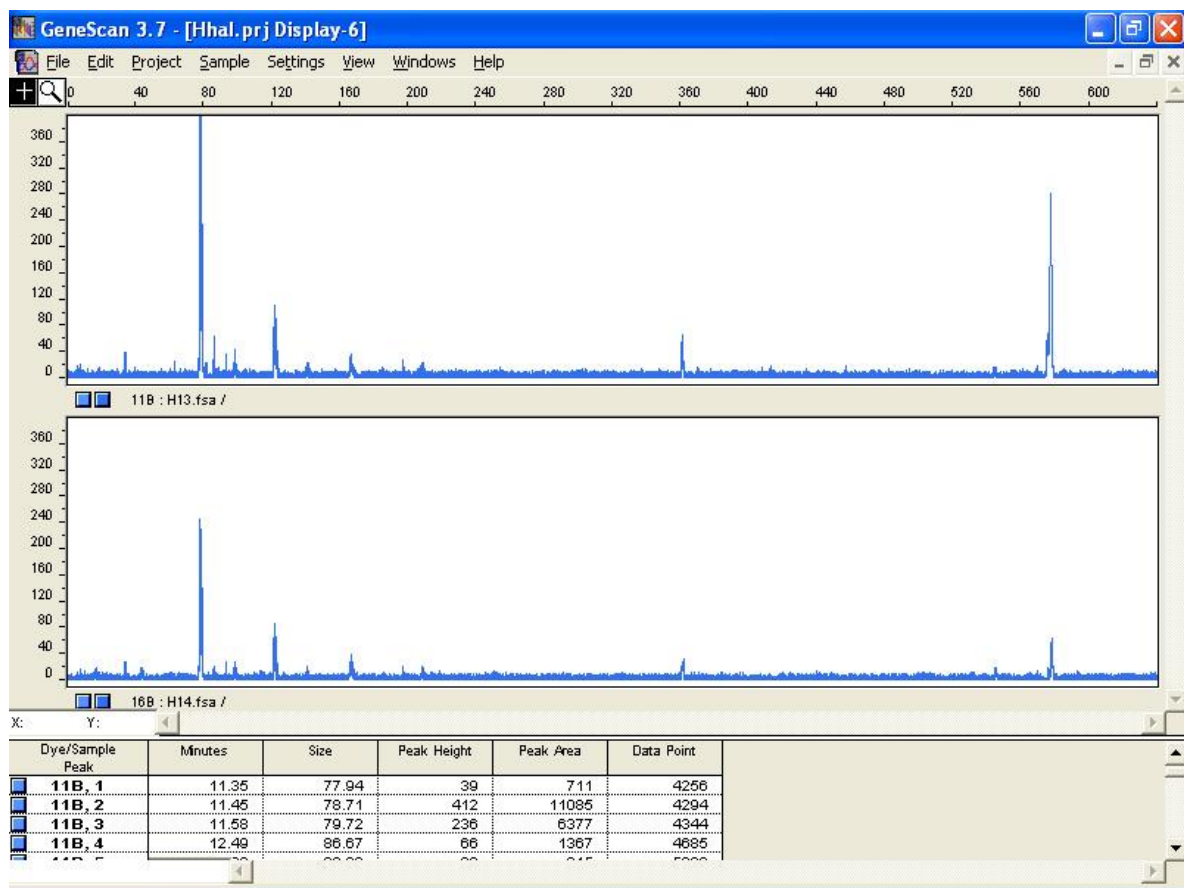


Figura 15. Eletroferogramas T-RFLP das amostras H13 e H14, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 6

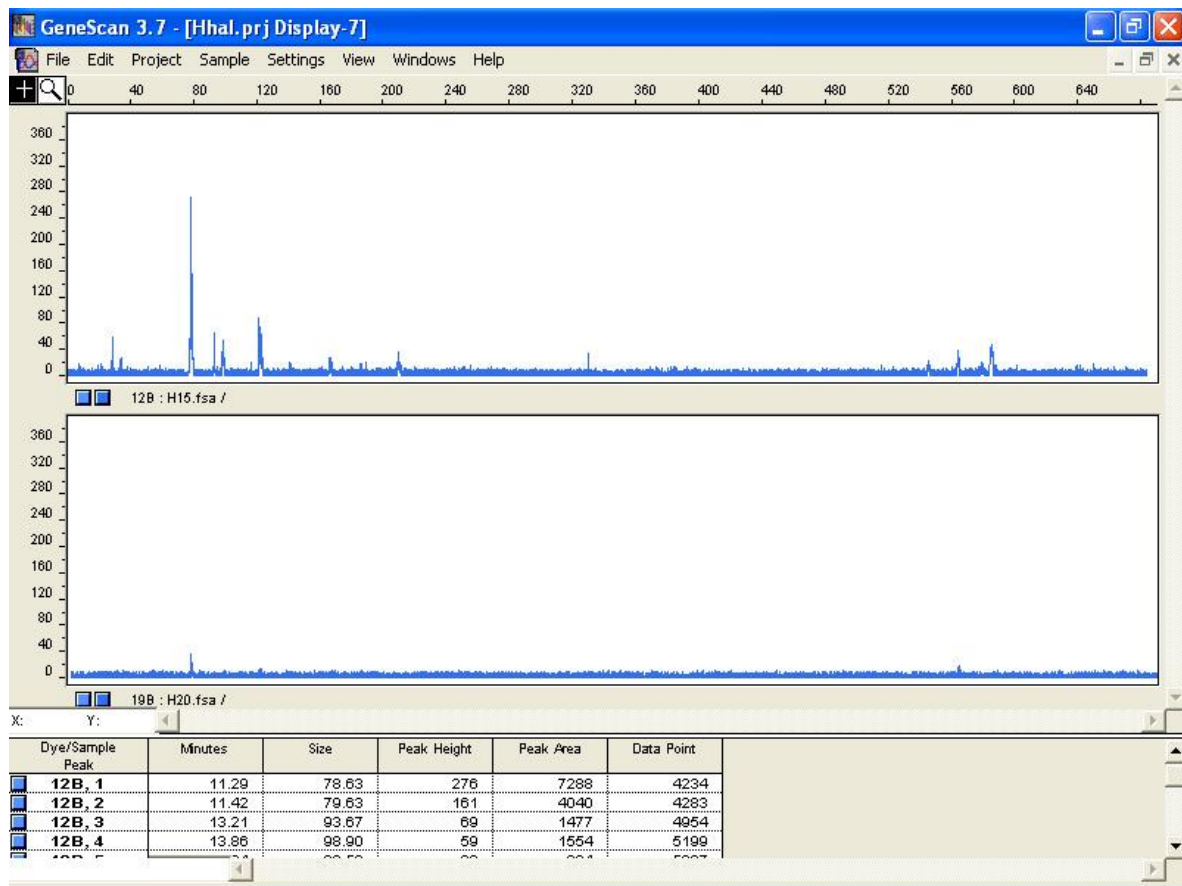


Figura 16. Eletroferogramas T-RFLP das amostras H15 e H20, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 7

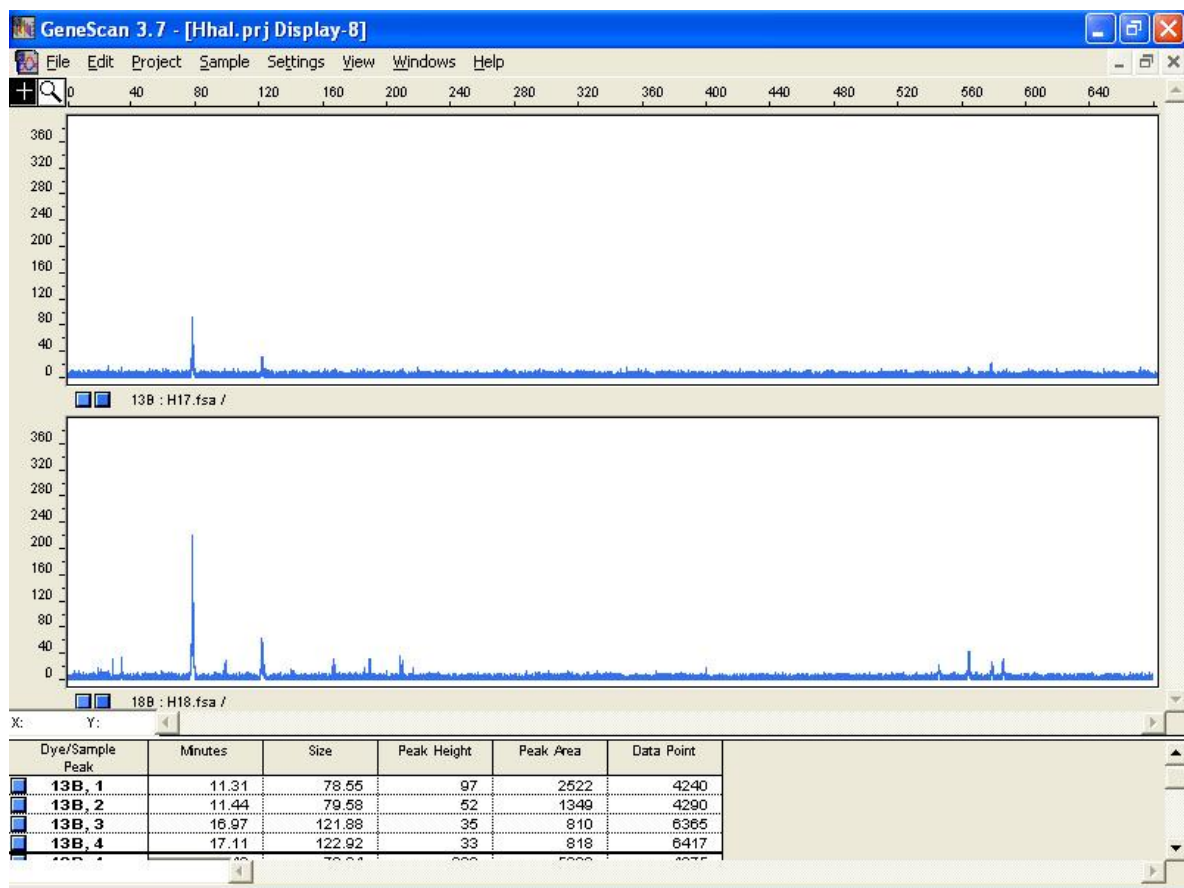


Figura 17. Eletroferogramas T-RFLP das amostras H17 e H18, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 8

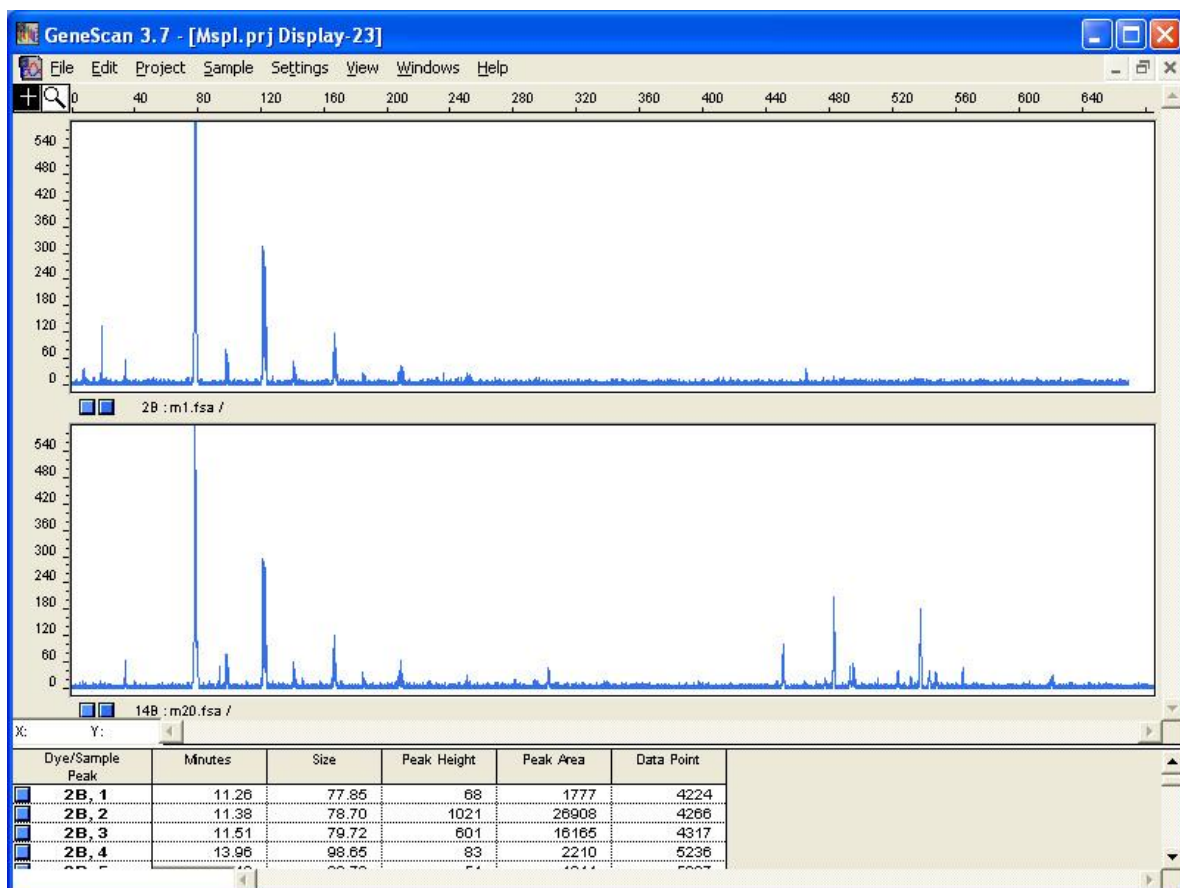


Figura 18. Eletroferogramas T-RFLP das amostras H2 e H20, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 9

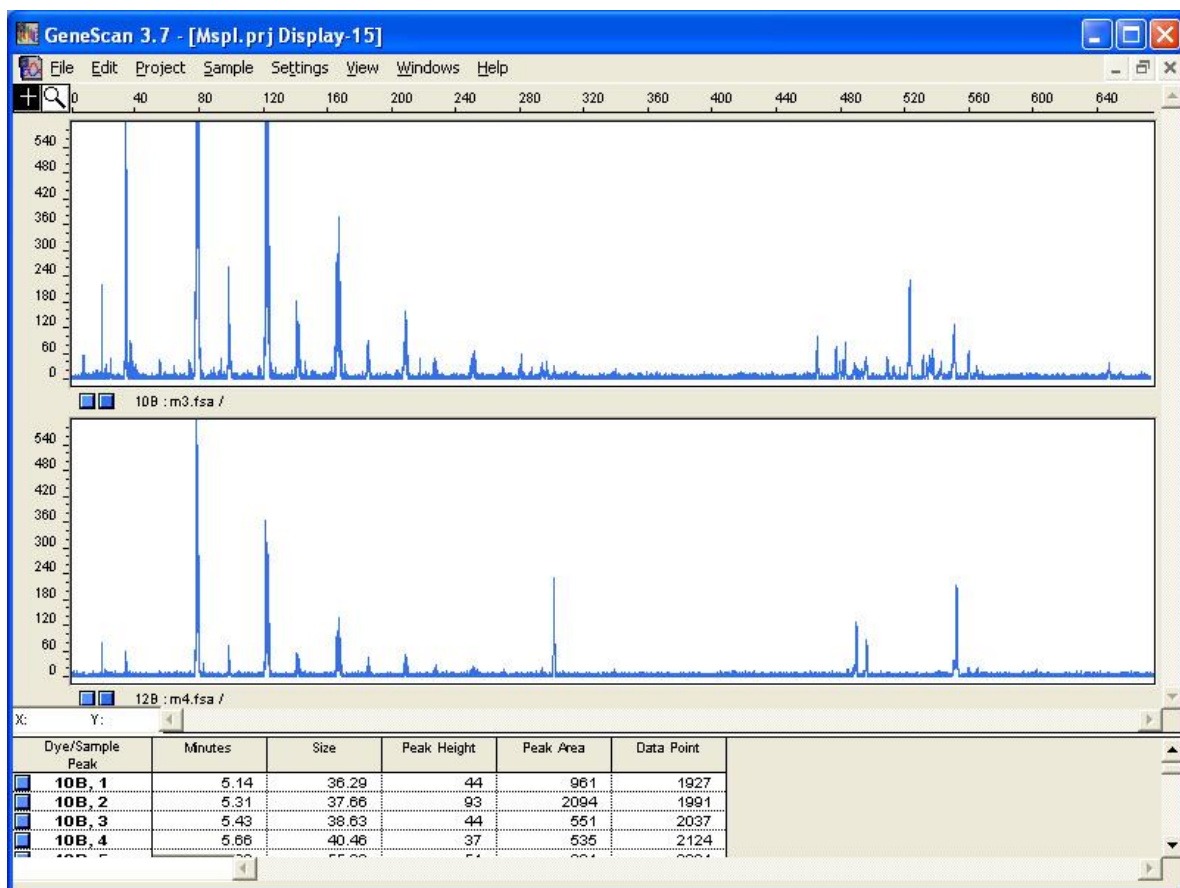


Figura 19. Eletroferogramas T-RFLP das amostras M3 e M4, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 10

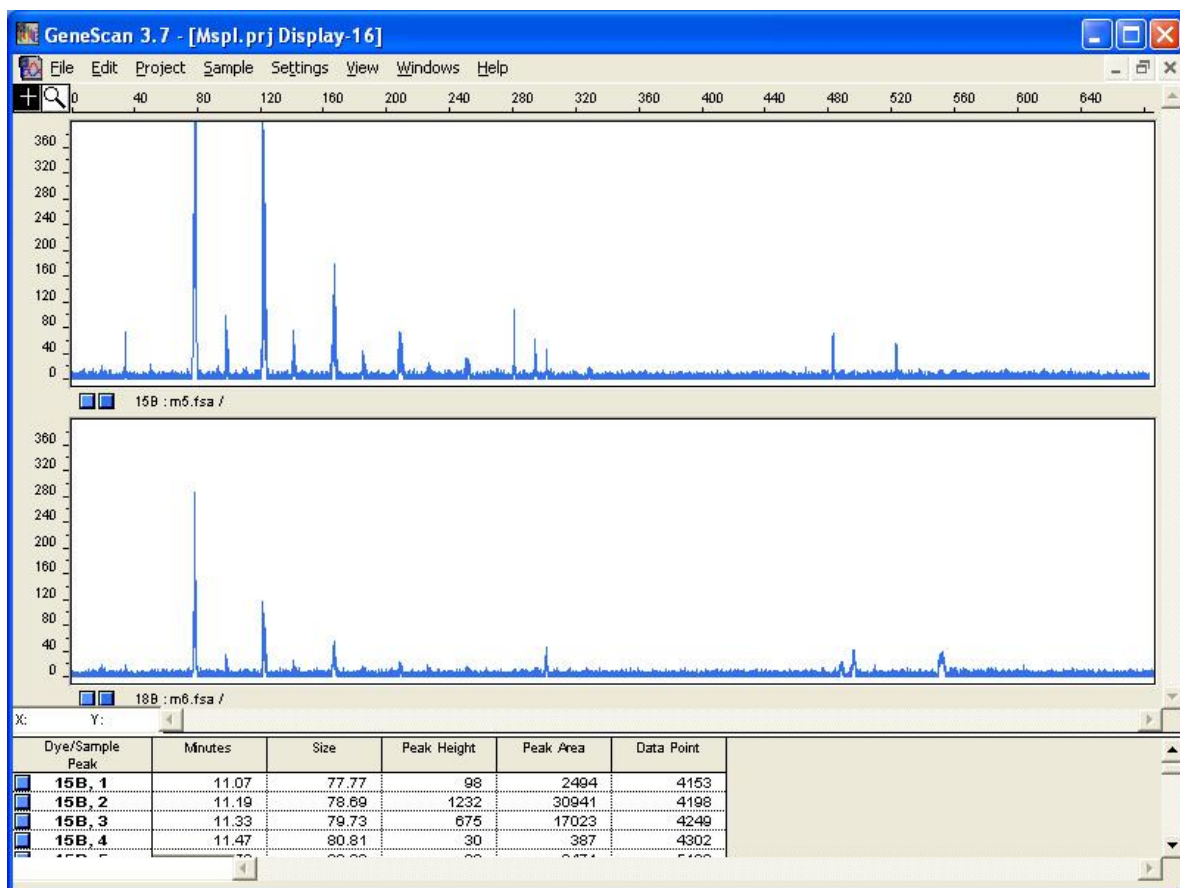


Figura 20. Eletroferogramas T-RFLP das amostras M5 e M6, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 11

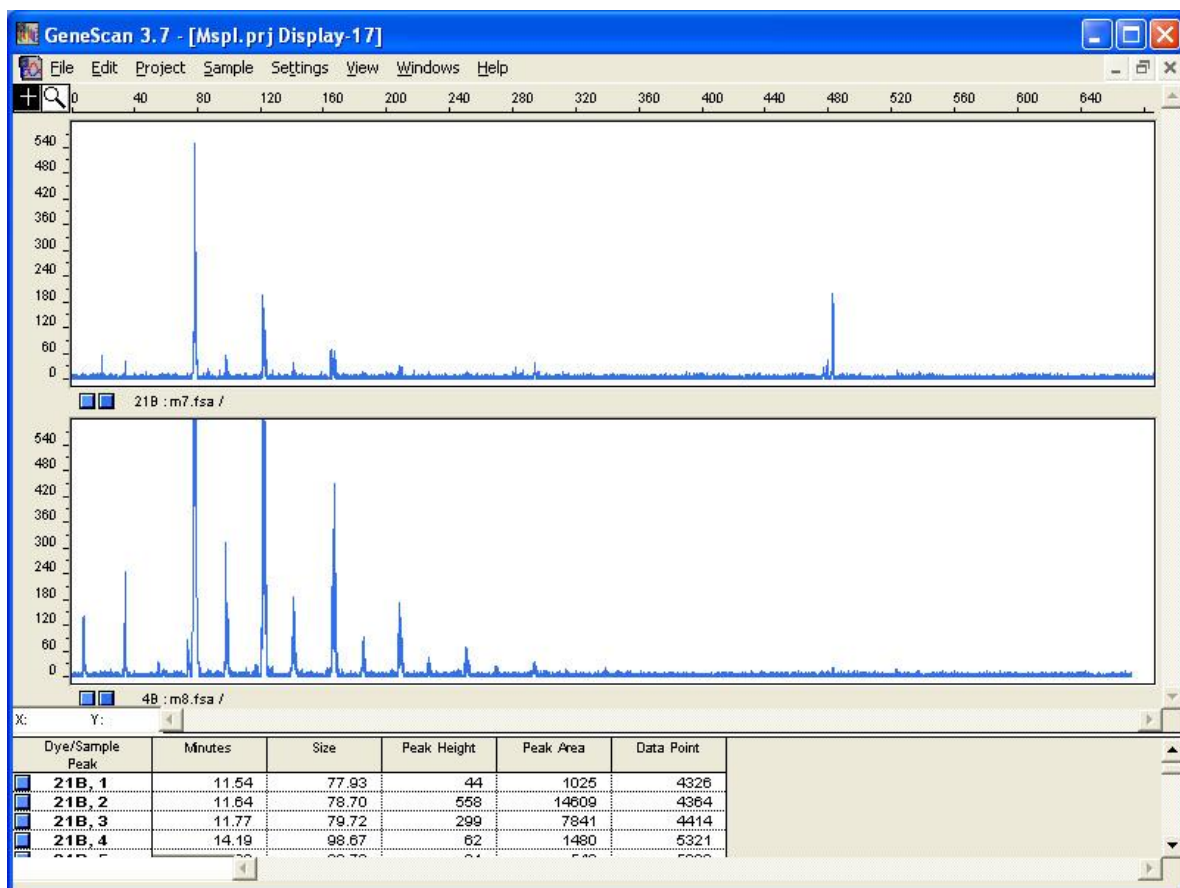


Figura 21. Eletroferogramas T-RFLP das amostras M7 e M8, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 12

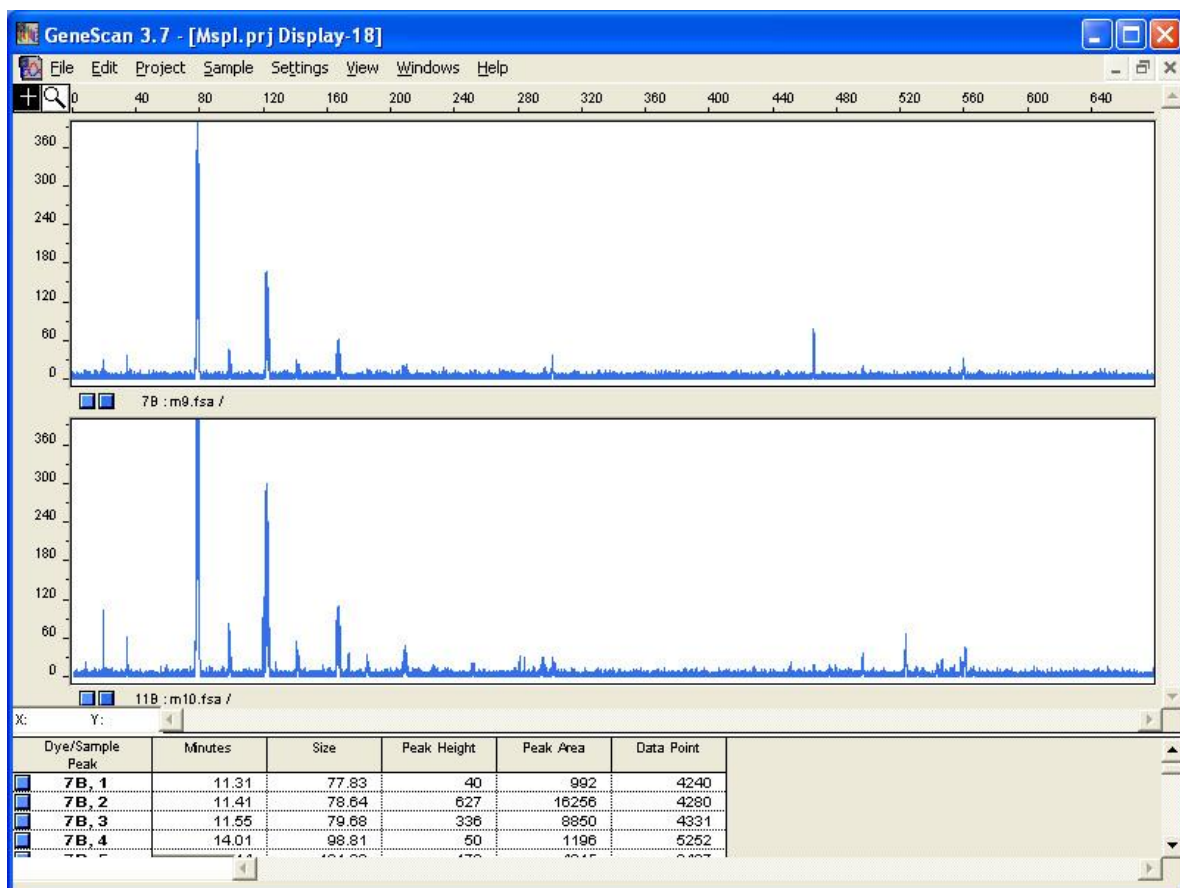


Figura 22. Eletroferogramas T-RFLP das amostras M9 e M10, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 13

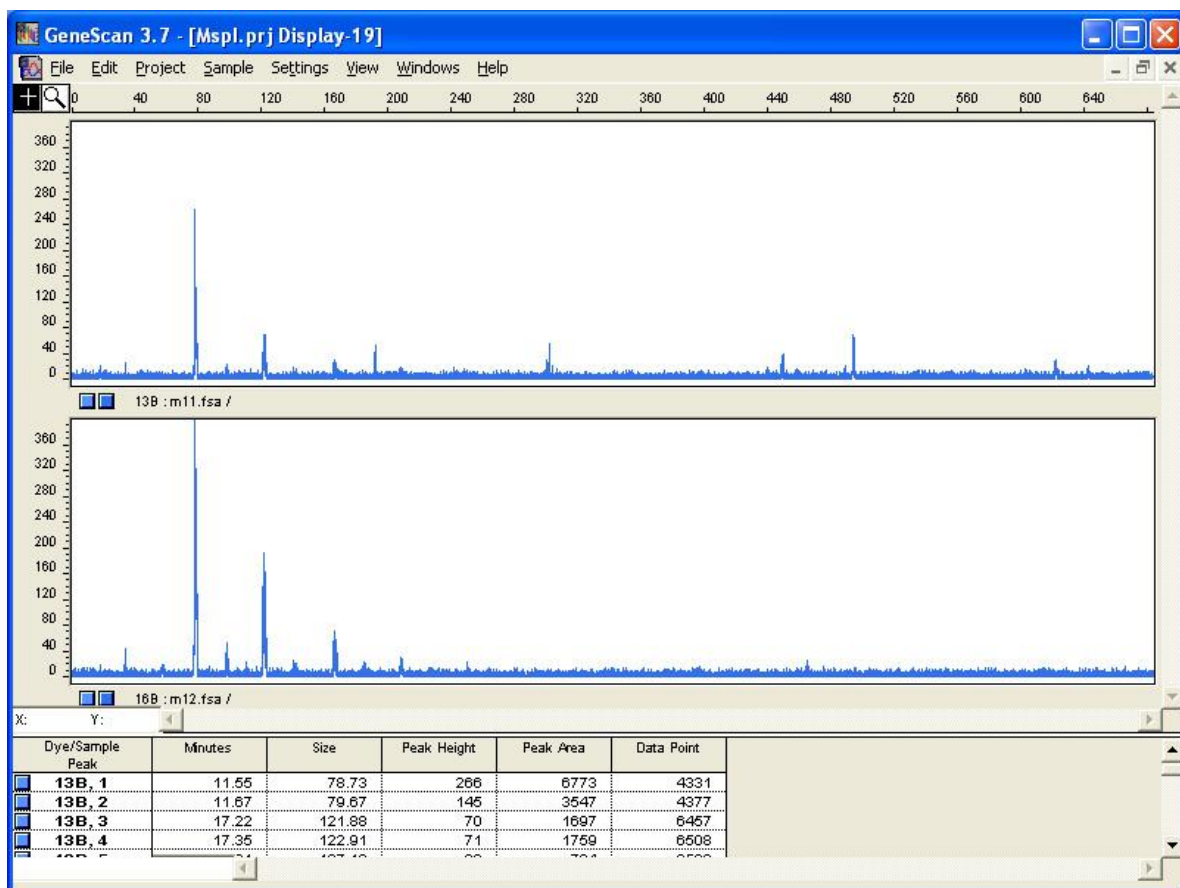


Figura 23. Eletroferogramas T-RFLP das amostras M11 e M12, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 14

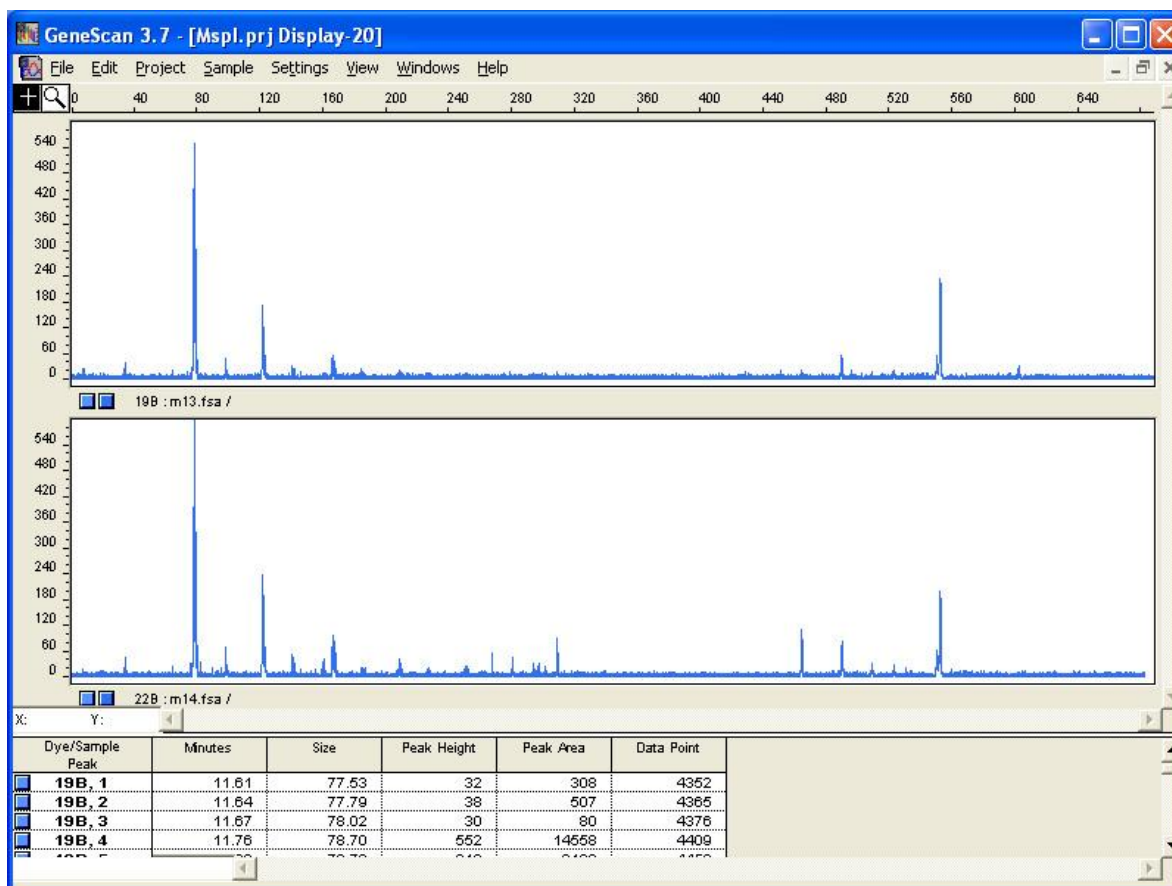


Figura 24. Eletroferogramas T-RFLP das amostras M13 e M14, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 15

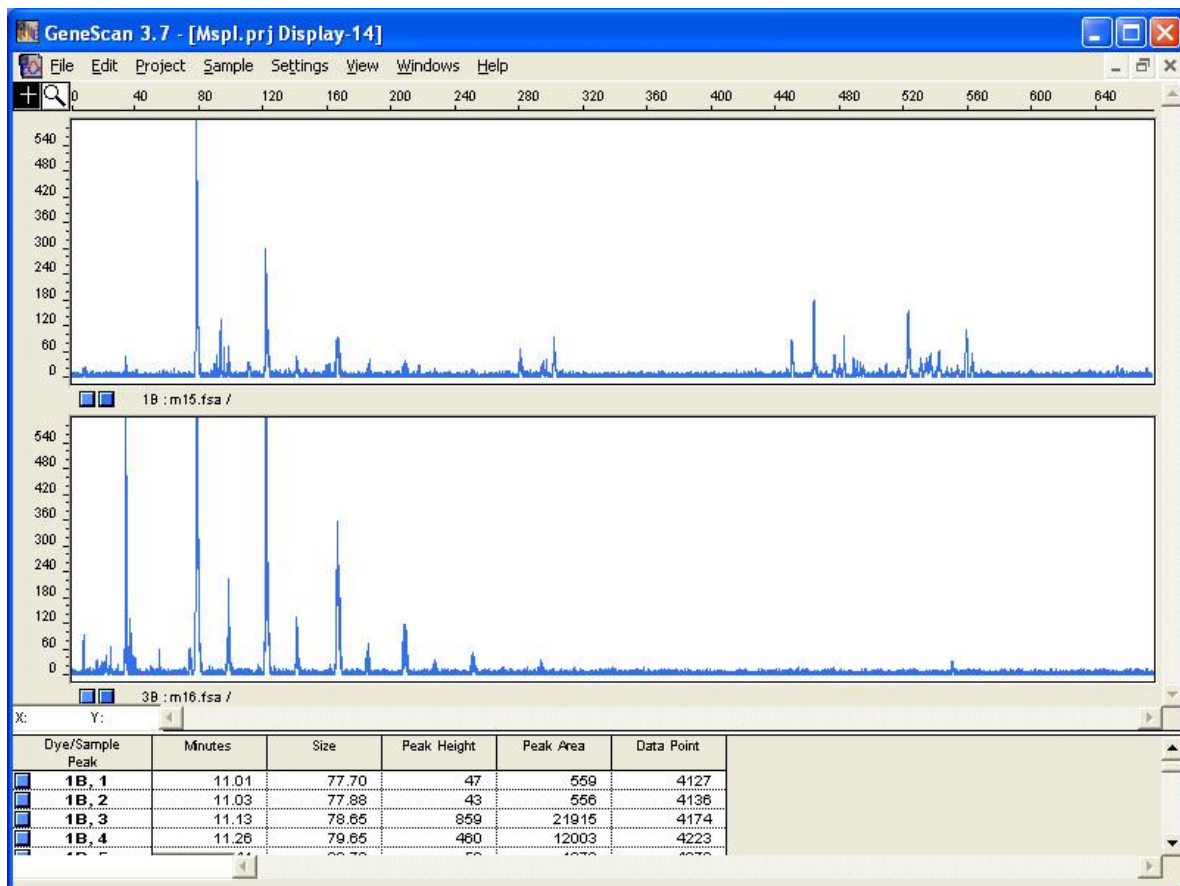


Figura 25. Eletroferogramas T-RFLP das amostras M15 e M16, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 16

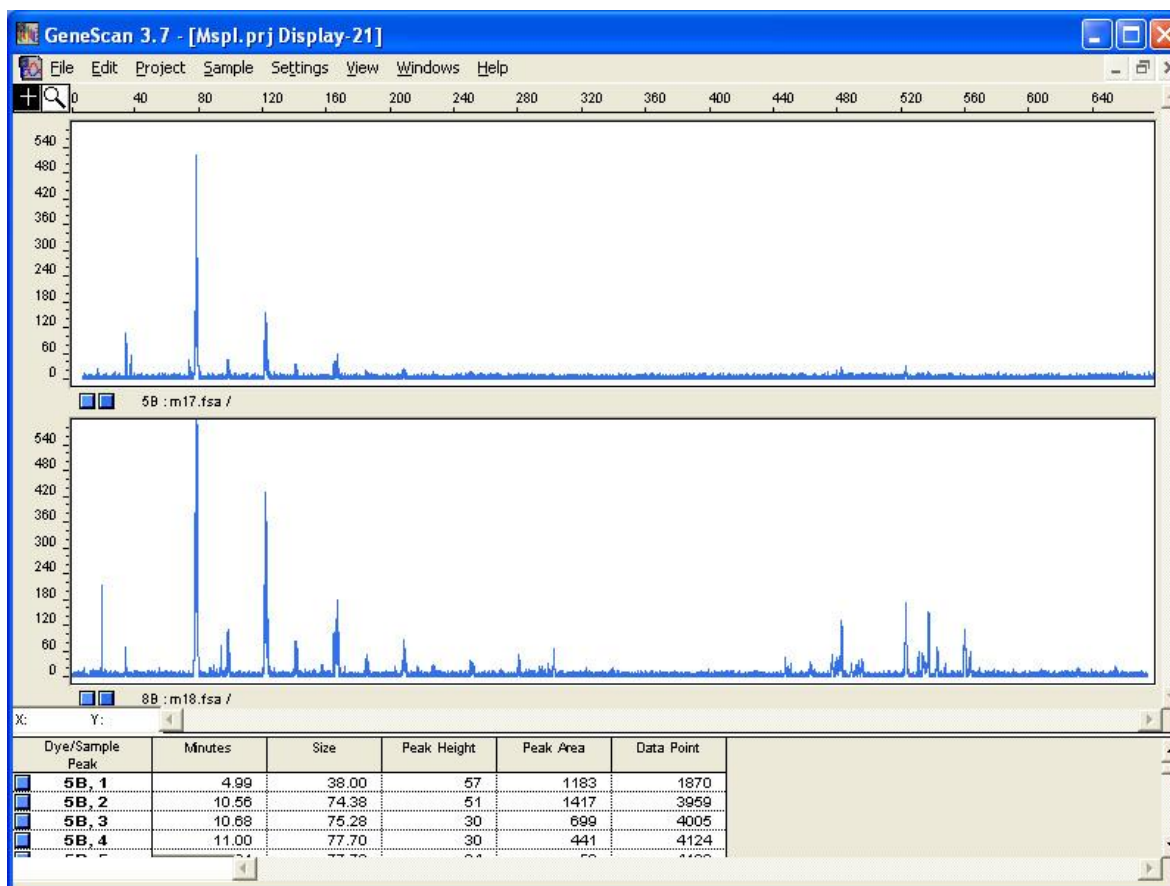


Figura 26. Eletroferogramas T-RFLP das amostras M17 e M18, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 17

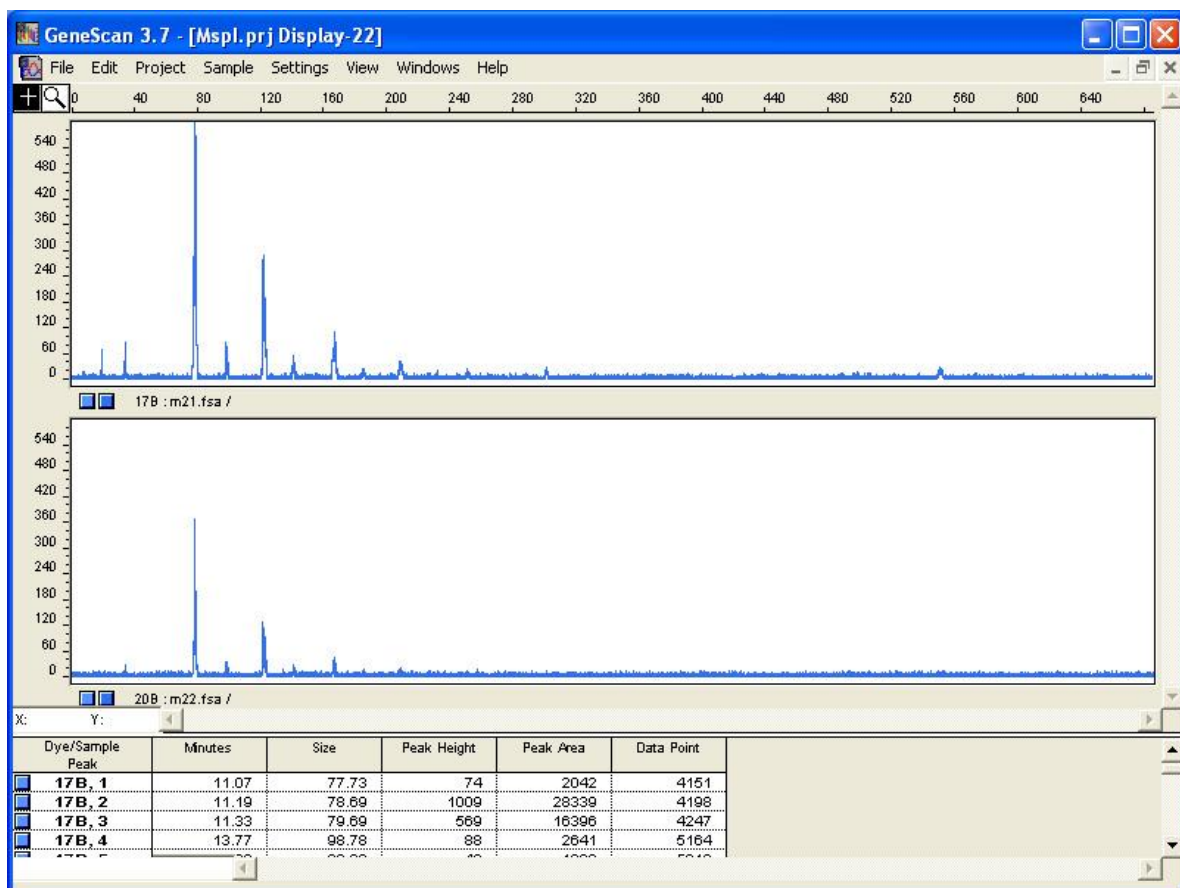


Figura 27. Eletroferogramas T-RFLP das amostras M21 e M22, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 18

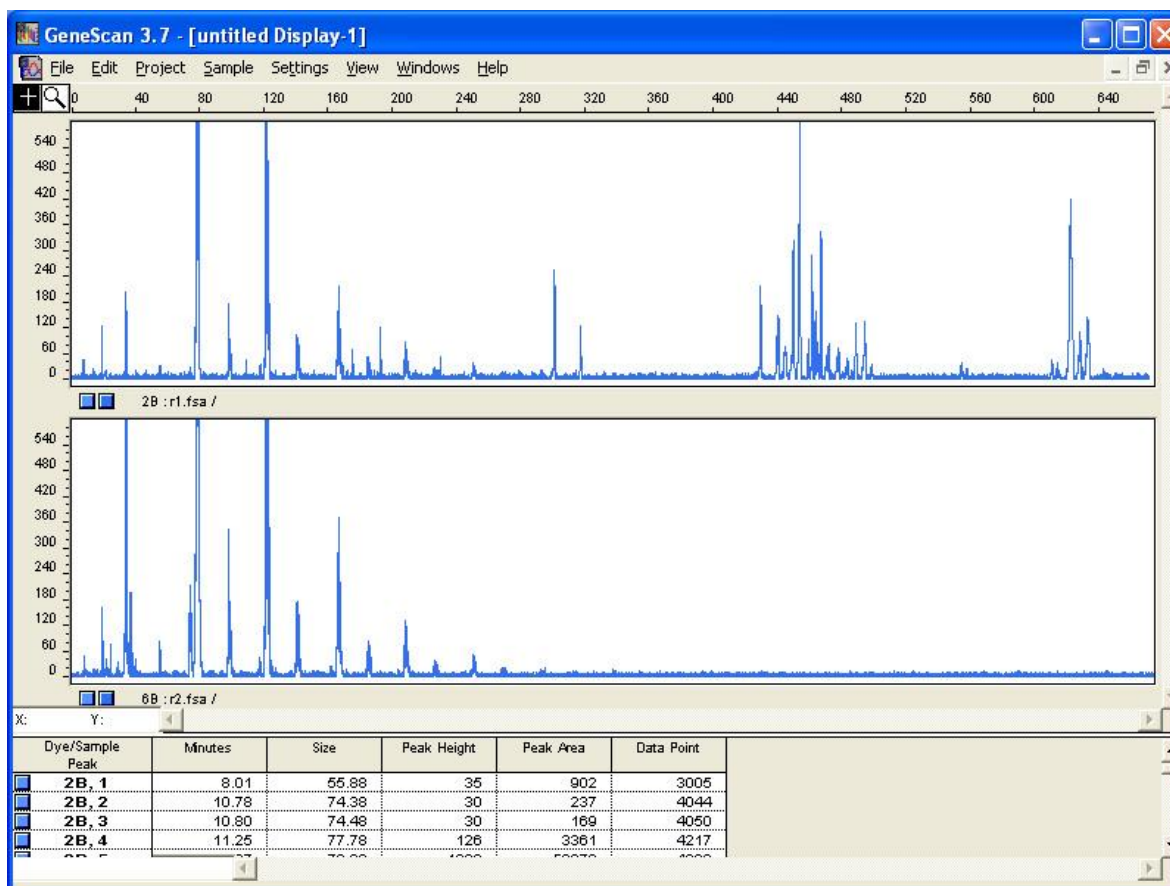


Figura 28. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R1 e R2, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 19

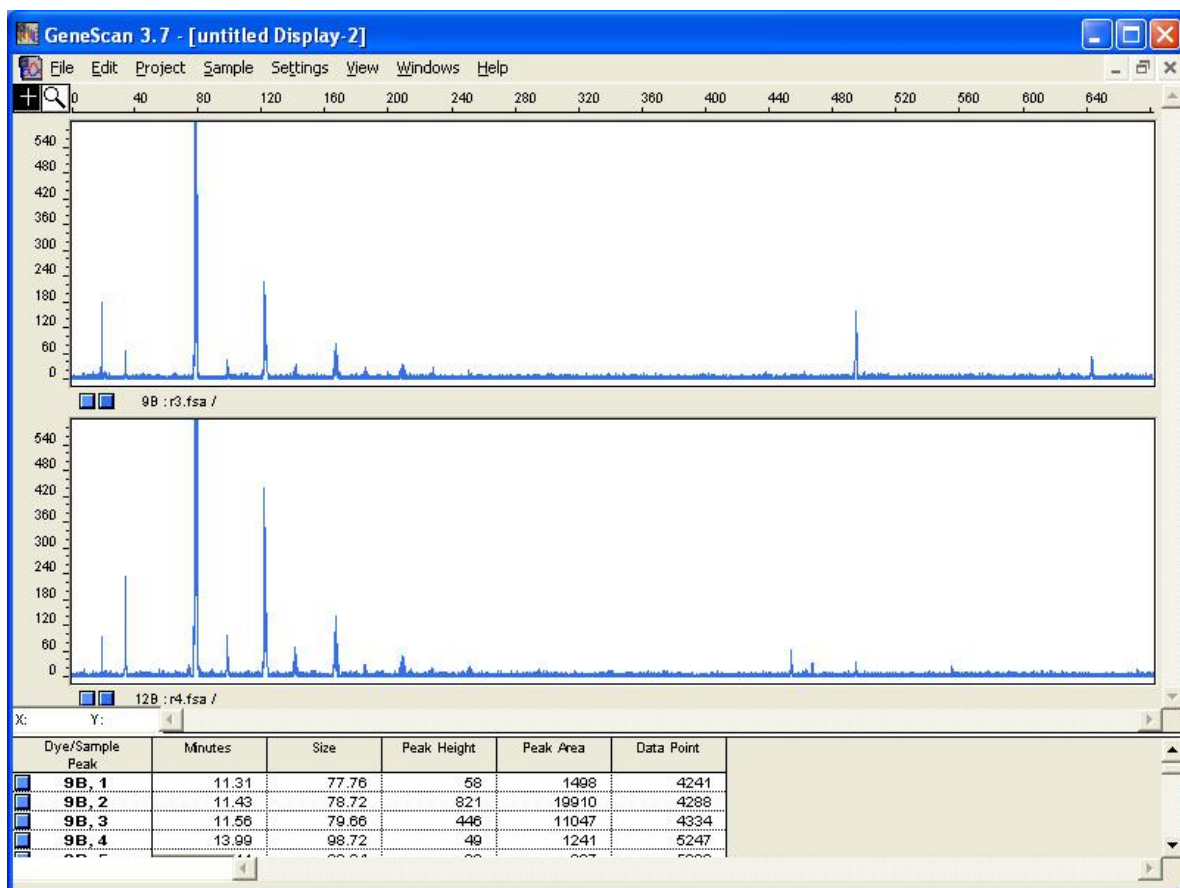


Figura 29. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R3 e R4, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 20

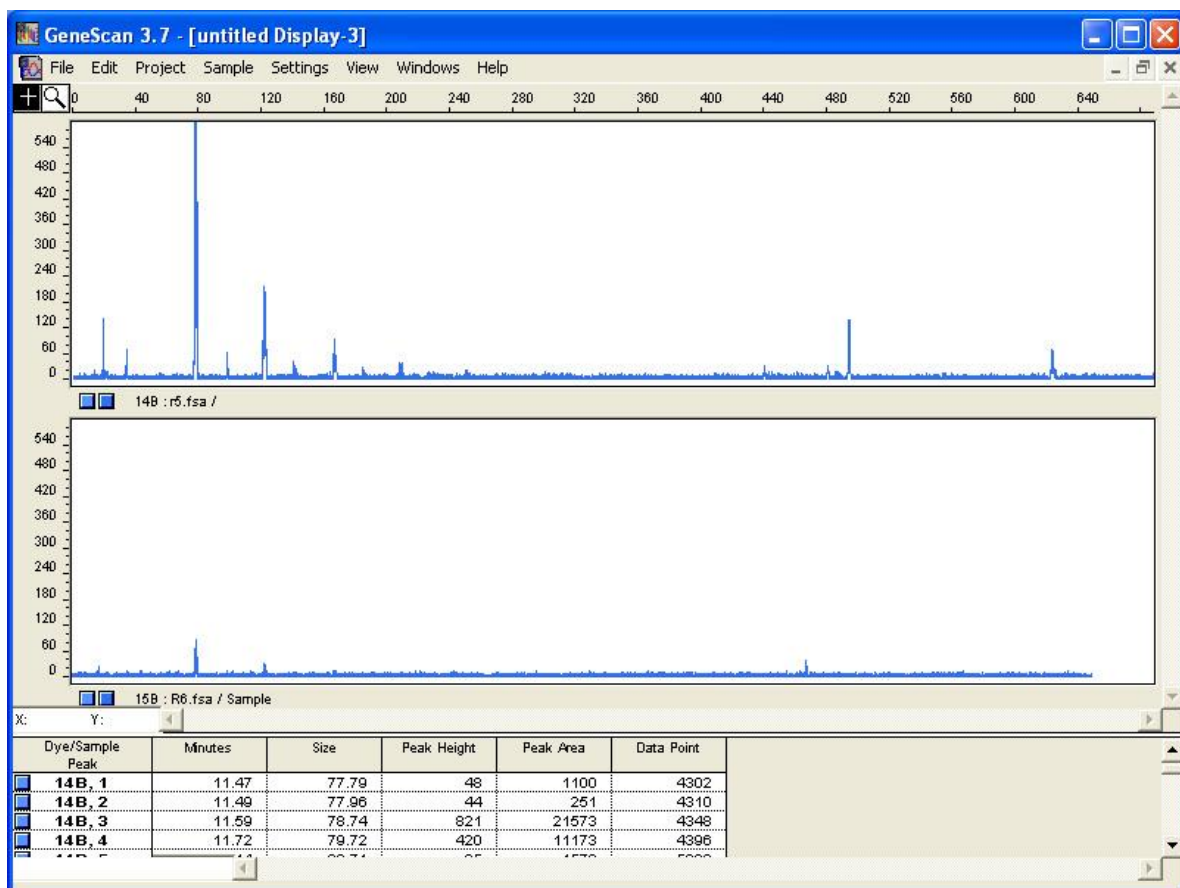


Figura 30. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R5 e R6, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 21

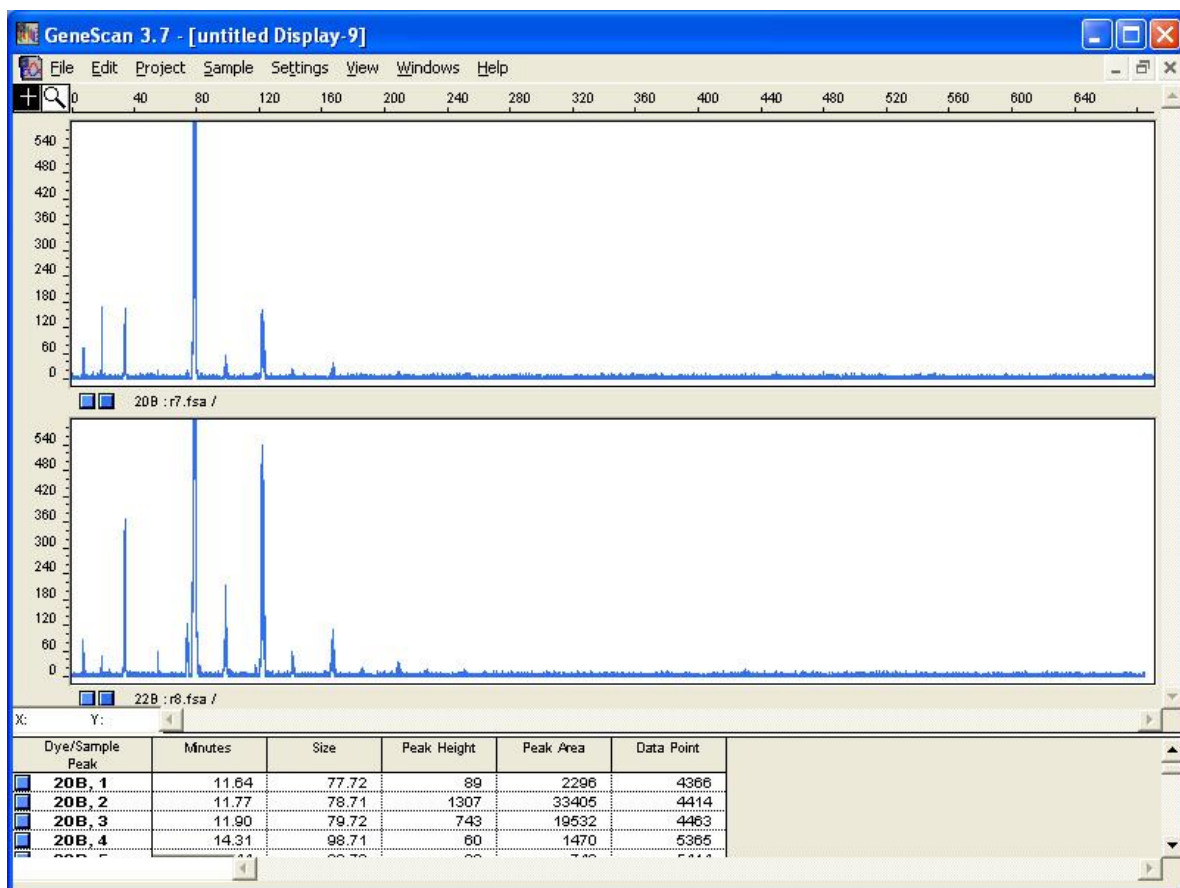


Figura 31. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R7 e R8, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 22

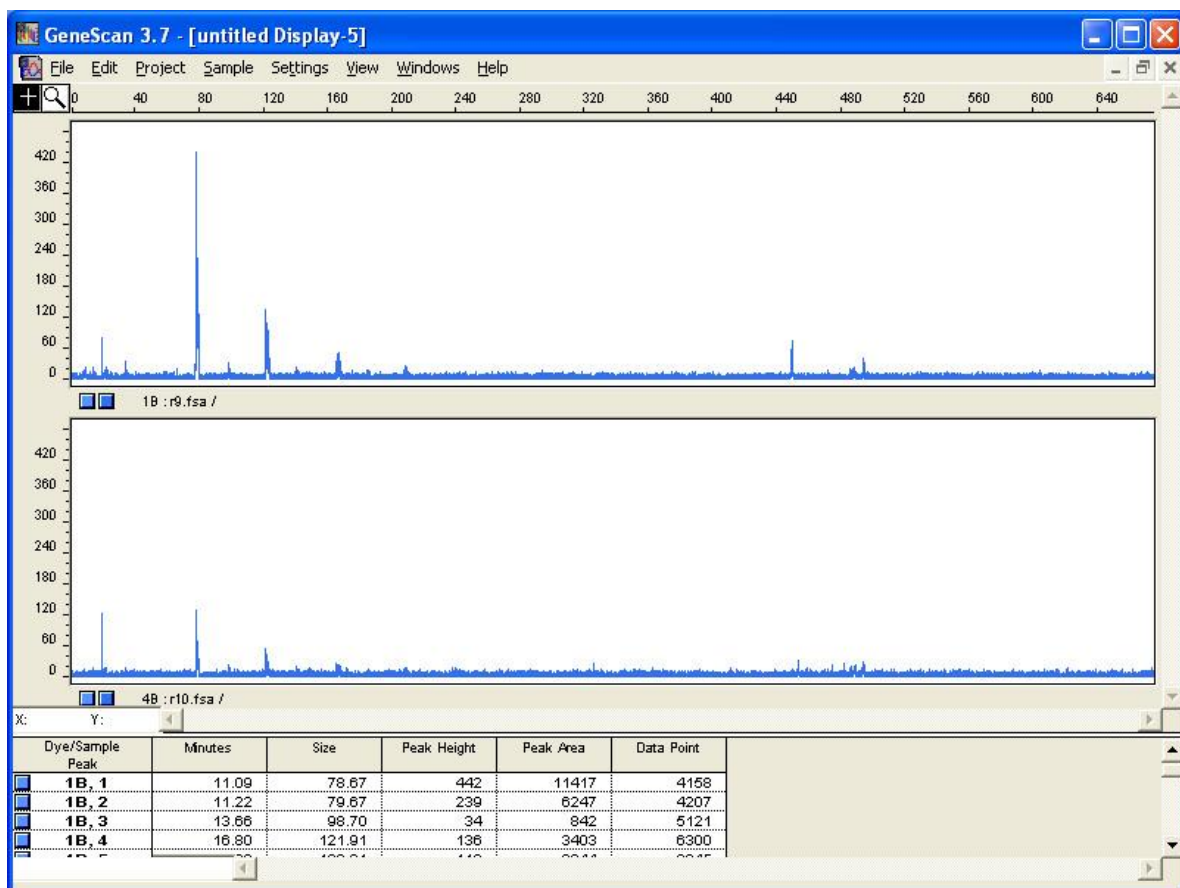


Figura 32. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R9 e R10, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 23

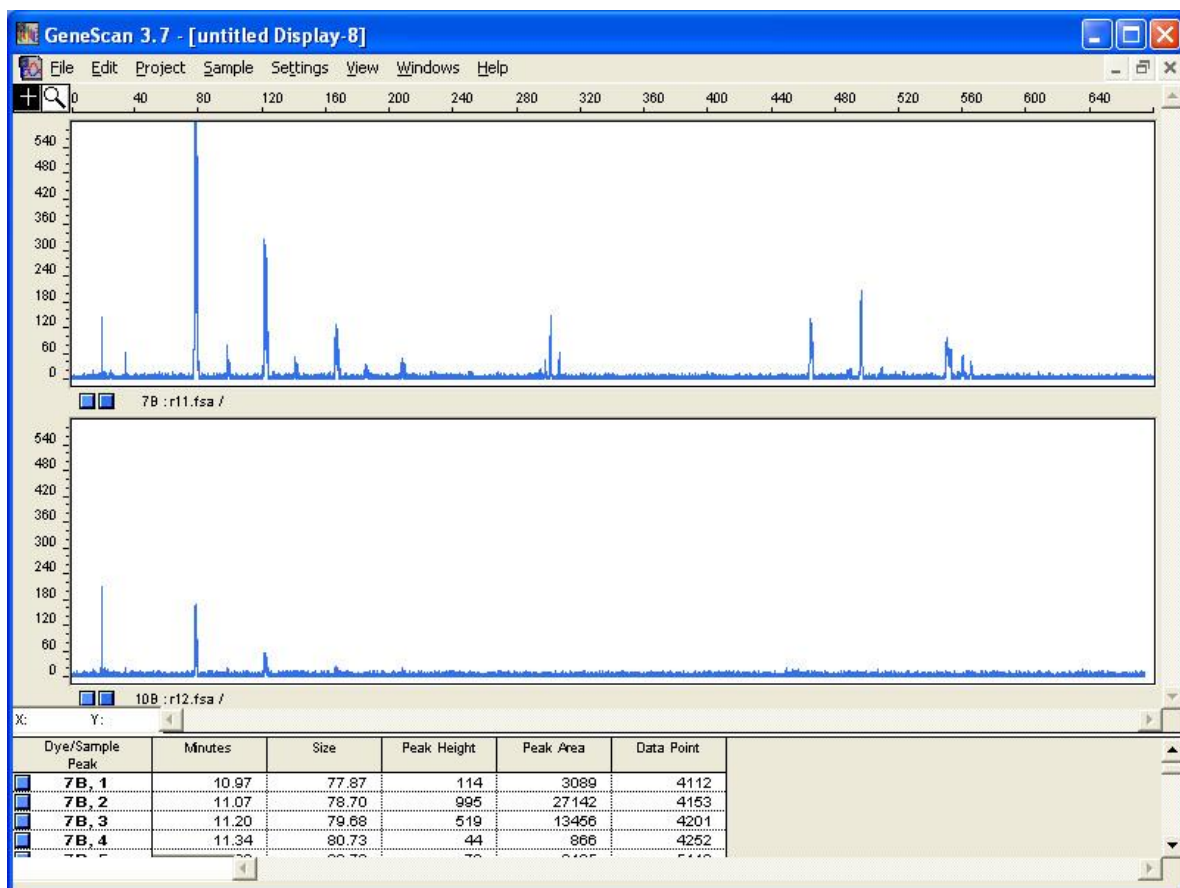


Figura 33. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R11 e R12, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 24

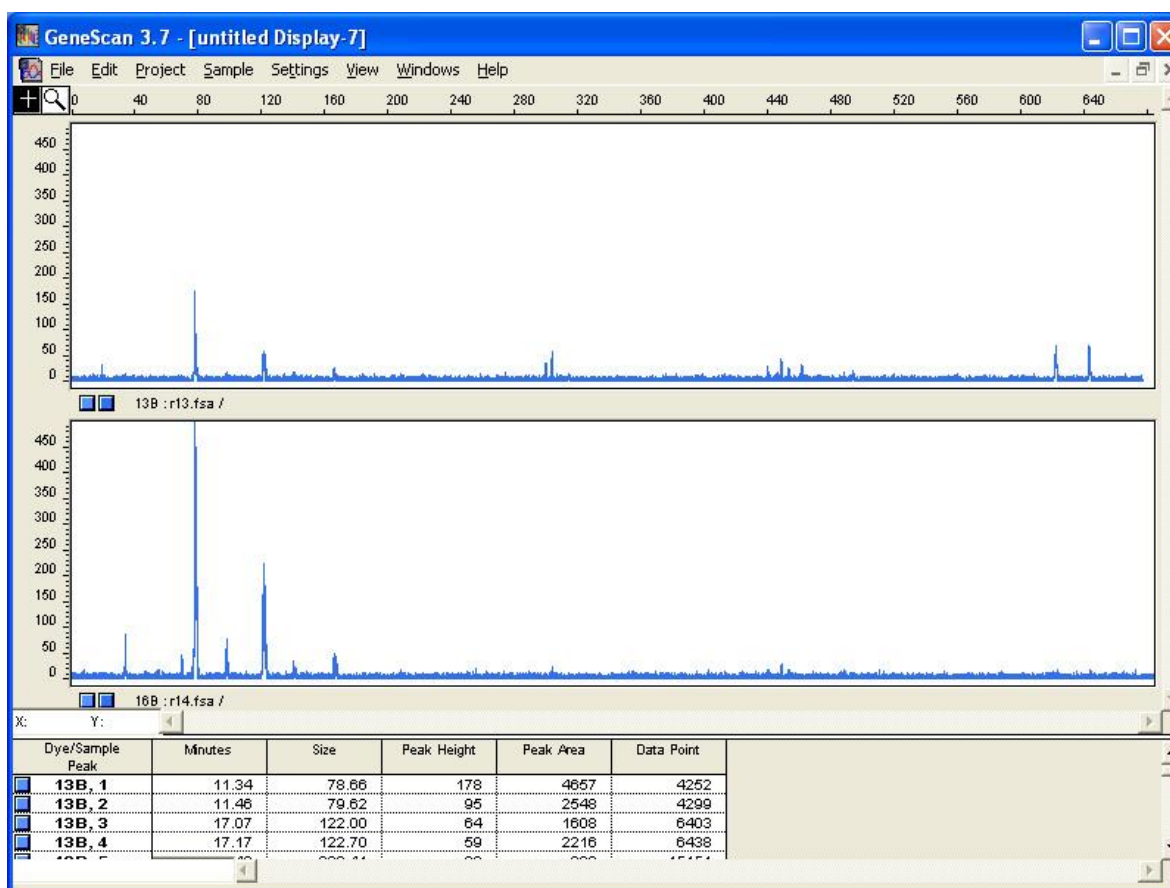


Figura 34. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R13 e R14, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 25

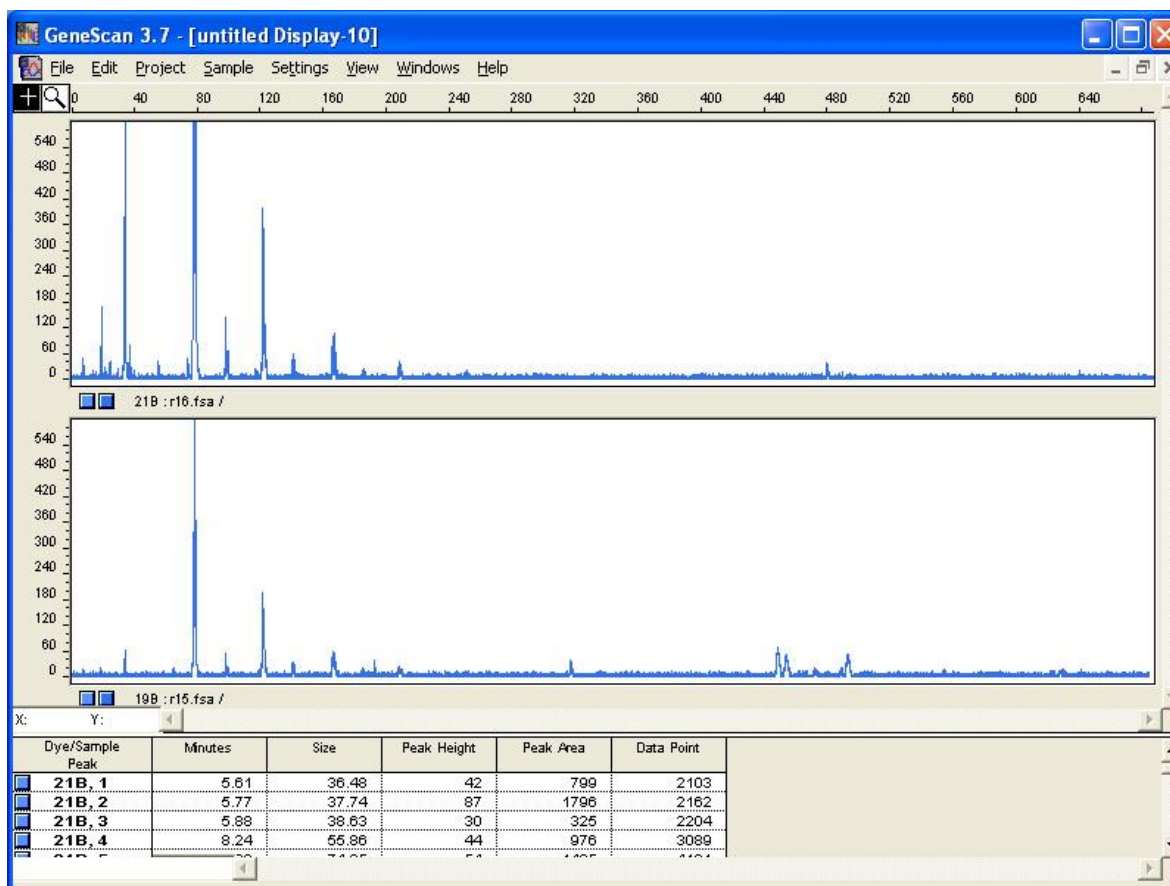


Figura 35. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R15 e R16, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 26

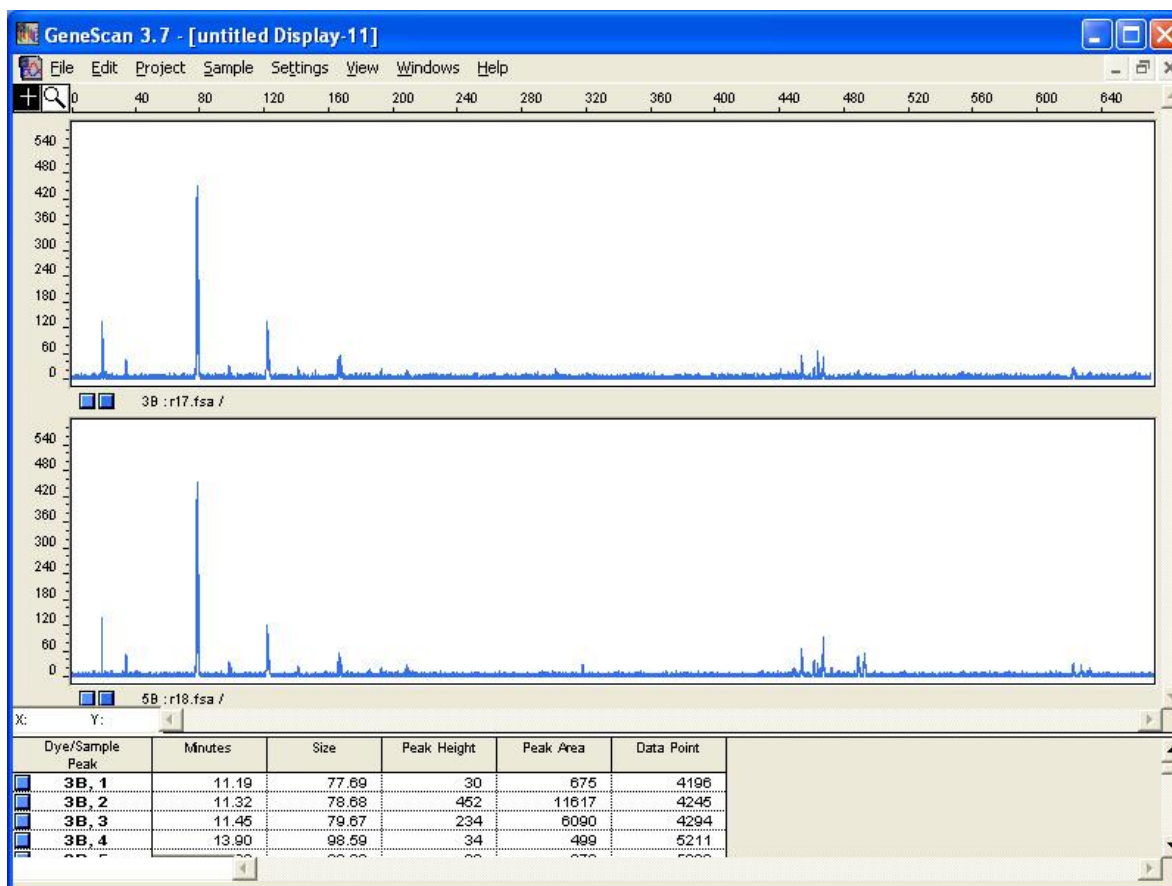


Figura 36. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R17 e R18, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 27

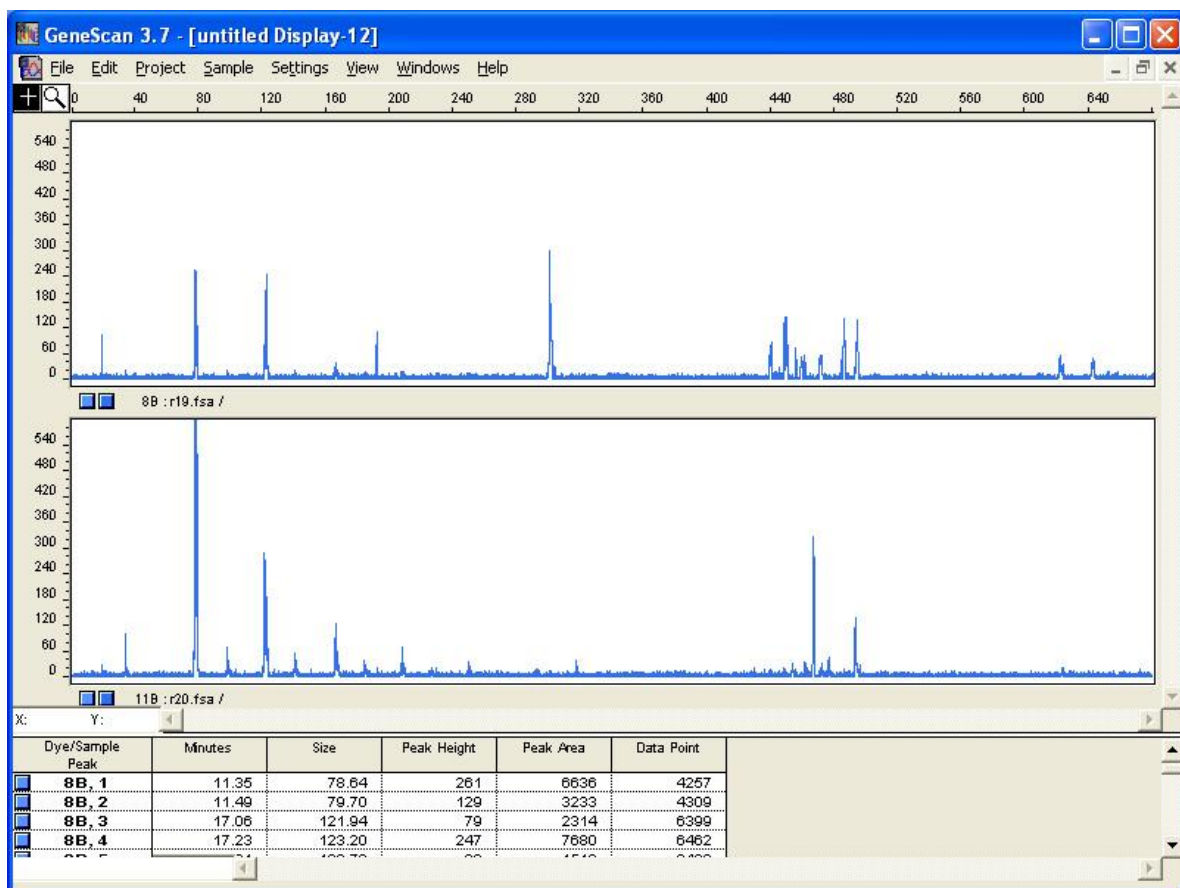


Figura 37. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R19 e R20, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 28

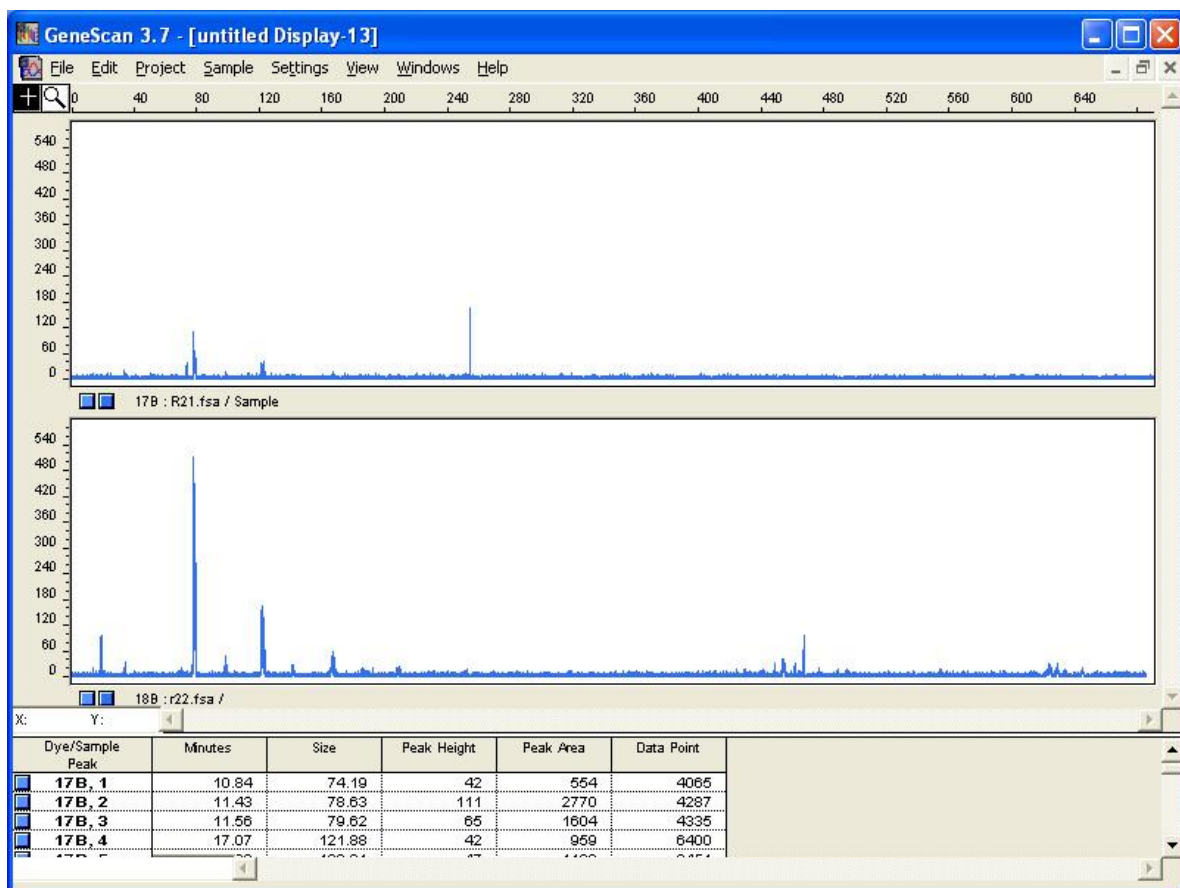


Figura 38. Eletroferogramas T-RFLP das amostras R21 e R22, gerados pelo programa GeneScan 3.7.

APÊNDICE 29

AMOSTRAS	#
EOS: supragengival	1
subgengival	2
FAZ: supragengival	3
subgengival	4
IFR: supragengival	5
subgengival	6
JJR: supragengival	7
Subgengival	8
UMR: supragengival	9
Subgengival	10
MCFP: supragengival	11
Subgengival	12
NAFS: supragengival	13
Subgengival	14
RABB: subgengival	15
Subgengival	16
RVCM: subgengival	17
Subgengival	18
SAB: supragengival	19
Subgengival	20
SCB: subgengival	21
Subgengival	22

Figura 39. Tabela associativa entre os códigos referentes a pacientes e os números representando suas respectivas amostras supragengival e subgengival.

APÊNDICE 30

FICHA CLÍNICA

Dados Pessoais	
Nome do paciente: _____	
Data: __/__/____	
Endereço: _____	
Cidade: _____	Estado: _____
Telefone: _____	Data nasc: __/__/____ Sexo: ? M ? F

Anamnese	
Queixa principal: _____ História Médica: _____ _____ _____ Revisão de Sistemas: ? diabetes _____ ? hipertensão _____ ? distúrbios cardíacos _____ ? outros _____	Medicamentos em uso: ? antibióticos _____ ? antiinflamatórios _____ ? analgésicos _____ ? outros _____ Hábitos nocivos: ? tabagismo _____ ? alcoolismo _____ ? outros _____ _____

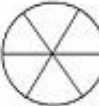
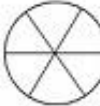
Sítios de Coleta	
 V  V  V  V  V  V D  P/L  P/L  P/L  P/L  P/L  P/L M	

Figura 40. Ficha clínica utilizada na coleta de amostras dos pacientes.

APÊNDICE 31

Tabela 4. Sexo, idade e gravidade da doença periodontal dos pacientes avaliados no estudo, no momento da coleta de amostras.

Pacientes	Sexo	Idade	Doença Periodontal
EOS	Feminino	33 anos	Agressiva
FAS	Masculino	55 anos	Crônica
IFR	Feminino	54 anos	Crônica
JJR	Masculino	47 anos	Crônica
LIMR	Feminino	57 anos	Crônica
MCFP	Feminino	59 anos	Crônica
NAFS	Masculino	41 anos	Crônica
RABB	Feminino	27 anos	Agressiva
RVCM	Feminino	39 anos	Agressiva

ANEXO 1



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



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise metagenômica e metatranscriptômica da microbiota oral: Bioprospecção de genes associados à periodontite**", protocolo nº 075/2008, dos pesquisadores Daniel Saito, Jose Francisco Höffling, Reginaldo Bruno Gonçalves e Sérgio Eduardo Braga da Cruz, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 21/08/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the oral microbiota: bioprospection of genes associated with periodontitis**", register number 075/2008, of Daniel Saito, Jose Francisco Höffling, Reginaldo Bruno Gonçalves and Sérgio Eduardo Braga da Cruz, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

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

ANEXO 2

Protocolos CENA T-RFLP

PCR

H ₂ O	14,8 ul	35,7 ul
10x PCR Buffer	2,5 ul	5,0 ul
MgCl ₂	1,0 ul	2,0 ul
dNTP	0,5 ul	1,0 ul
Primer 10uM 27F (fam)	0,5 ul	0,5 ul
Primer 10uM 1492R	0,5 ul	0,5 ul
TAQ 5 U/ul	0,2 ul	0,3 ul
DNA	5,0 ul	5,0 ul
Volume Total	25 ul	50 ul

Desnaturação inicial	94°C	3 minutos
Desnaturação	94°C	30 segundos
Anelamento	59°C	45 segundos
Extensão	72°C	1 minuto
Extensão final	72°C	15 minutos

Purificação do produto de PCR

Ilustra GFX GE

Restrição

Água	8,29 ul	PCR
Buffer da Enzima	1,5 ul	37°C ----- 2 horas
BSA	0,15 ul (HhaI)	65°C – 20 minutos
Enzima	0,06 ul (20 U/ul)	-3°C ----- 8
DNA	5,0 ul	
Total	15 ul	
HhaI (20U/ul)	MspI (20U/ul)	RsaI (10U/ul)

Precipitação dos fragmentos de DNA

- 1) Transferir todo o DNA sequenciado (15 µL) para tubos de PCR. Adicionar 2,0 µL de Tampão Acetato de Sódio/EDTA, vortexar e dar um pulso, em seguida adicionar mais 60 µL de Etanol 100% e vortexar. *(Adicionar primeiro o acetato)*
- 2) Centrifugar a 12.000 rpm, por 15 minutos, a temperatura ambiente;
- 3) Descartar o sobrenadante (totalmente) com micropipeta (P 200). Não deixar a ponteira tocar o precipitado. Usar a mesma ponteira para todos os tubos;
- 4) Lavar com 150 µL de etanol 70% (dihir em água ultrapura autoclavada imediatamente antes de usar). Vortexar e centrifugar a 12.000 rpm, por 5 minutos, a temperatura ambiente;
- 5) Descartar o sobrenadante (totalmente) com micropipeta (P 200);
- 6) Secar no Concentrador de DNA por 5-10 minutos à 45° C;
- 7) -Caso as amostras não sejam sequenciadas, armazená-las no freezer a – 20 °C por no máximo 3 semanas;
-Caso as amostras sejam imediatamente sequenciadas no ABI 3100, ressuspender em 10 µL de Hi-Di Formamide (tirá-las do freezer durante a secagem do DNA), agitar no vórtex e dar um pulso na microcentrifuga a 14.000 rpm.

Fórmula Acetato de Sódio/EDTA

- Acetato de Sódio 1,5 M
- EDTA 0,5 M

Adicionar 25 ml de EDTA 0,5M. pesar 6,15 g de acetato de sódio. Ajustar pH para 8. Completar com água para 50 ml. Autoclavar.

Armazenar amostras secas. No CENA, ressuspende em formamida HiDi e mais o padrão ROX.