



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



ANA CLÁUDIA BRAGA AMORAS ALVES
Cirurgiã - Dentista

**Análise da diversidade genética de *Prevotella intermedia*
em indivíduos com doença periodontal**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Microbiologia e Imunologia.

**PIRACICABA
2003**



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



ANA CLÁUDIA BRAGA AMORAS ALVES
Cirurgiã - Dentista

**Análise da diversidade genética de *Prevotella intermedia*
em indivíduos com doença periodontal**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Francisco Höfling

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Prof. Dr. Sebastião Luiz de Aguiar Gregghi

Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum

Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

PIRACICABA

2003

Ficha Catalográfica

Al87a Alves, Ana Cláudia Braga Amoras.
Análise da diversidade genética de *Prevotella intermedia* em indivíduos com doença periodontal. / Ana Cláudia Braga Amoras Alves. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
x, 89 p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Prevotella intermedia*. 2. Genética. 3. Diversidade. I. Gonçalves, Reginaldo Bruno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

A Deus, por eu ter conseguido chegar até aqui!

Aos meus pais, Paulo e Lydia, por tudo que sou e conquistei.

Ao meu marido, Bruno, por seu amor e cumplicidade.

Dedico esse trabalho

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, por todas as demonstrações de carinho.

Aos meus sogros, Sérgio e Ana Rita, pelo apoio incondicional durante essa caminhada.

Minha gratidão

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Que me possibilitou a aquisição de novos conhecimentos ao longo desses anos, minha admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores da área de Microbiologia e Imunologia Prof. Dr. José Francisco Höfling e Prof. Dr. Celso P. da Costa (*in memoriam*) pela amizade e contribuição à minha formação.

À minha amiga Marlise pelo carinho e apoio em cada minuto na realização deste trabalho.

Às minhas amigas Iriana, Regianne, Rita e Meire pelo companheirismo e momentos de alegria. Vou leva-las no meu coração.

À minha amiga Maria pelo exemplo de bondade e carinho

Às amigas Viviane, Ezilmara, Flaviana, Ângela e Letícia pela amizade que surgiu

Aos colegas e funcionários do laboratório, Marcelo Napimoga, Daniel Saito, Marcelle, Janaína, Magda, Marcelo Boriollo, Rafael, Thais, Wagner, Wilma e Anderson pelo convívio durante esses anos.

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio do Diretor Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.

Ao Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho, coordenador dos cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

À Profa. Dra. Silvana Pereira Barros, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

Ao Departamento de Morfologia, Área de Histologia, na pessoa do Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, pela colaboração e disponibilidade em permitir o uso do Laboratório e de Equipamento de Fotodocumentação para desenvolvimento experimental de parte deste trabalho.

A disciplina de Endodontia, na pessoa da Prof^a Dr^a Brenda de Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pela disponibilidade em permitir o uso do equipamento necessário para identificação bacteriana para desenvolvimento experimental de parte dessa pesquisa.

A disciplina de Periodontia, na pessoa do Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum, pela disponibilidade em permitir a seleção de voluntários na clínica de especialização em Periodontia.

Aos voluntários pela disponibilidade de participar deste trabalho.

À FAPESP pela concessão de recurso financeiro.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO -----	1
ABSTRACT -----	2
1. INTRODUÇÃO -----	3
2. REVISÃO DA LITERATURA -----	8
2.1. Aspectos taxonômicos -----	8
2.2. Anaeróbios pigmentados negros e a doença periodontal -----	11
2.3. Análise genotípica de anaeróbios pigmentados negros -----	16
3. PROPOSIÇÃO -----	26
4. METODOLOGIA -----	27
5. RESULTADOS -----	44
6. DISCUSSÃO -----	61
7. CONCLUSÃO -----	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	78
ANEXO -----	85

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética da espécie *Prevotella intermedia* em indivíduos com doença periodontal, por meio de duas técnicas, a reação em cadeia da polimerase com *primers* arbitrários (AP-PCR) e análise heteroduplex de produtos amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Amostras subgengivais foram obtidas de sítios com e sem destruição periodontal de 36 voluntários. Após o cultivo e identificação bacteriana, os isolados de *P. intermedia* foram submetidos à técnica de genotipagem utilizando AP-PCR. Adicionalmente, as amostras clínicas subgengivais, com resultado positivo para o cultivo de *P. intermedia*, foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primer* espécie específico e em seguida, os produtos amplificados foram submetidos à análise heteroduplex. Os resultados revelaram que os anaeróbios pigmentados negros foram mais freqüentes em sítios doentes, sendo a *P. intermedia* a mais prevalente dentre as espécies isoladas. A maioria dos indivíduos foi colonizada por um a dois tipos de genótipos, com relação positiva entre o número de clones e a profundidade de sondagem. Não houve detecção de genótipos idênticos entre os sítios de isolamento, em um mesmo ambiente bucal. Na análise interindivíduos, nenhum voluntário compartilhou o mesmo perfil eletroforético, indicando ampla heterogeneidade genética da espécie. Coincidindo com a técnica de AP-PCR, a análise heteroduplex detectou a presença de uma a dois clones distintos de *P. intermedia* nas amostras clínicas. Em conclusão, os indivíduos com doença periodontal abrigaram poucos tipos clonais e a coincidência de perfil genético entre sítios de um mesmo indivíduo e entre indivíduos não foi observada.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the genotypic diversity of *P. intermedia* on subjects with periodontal disease using two techniques, the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) method and heteroduplex analysis from products amplified by polymerase chain reaction (PCR). Subgingival plaque samples were taken from the sites with and without periodontal destruction in 36 volunteers. After the culturing and identification procedures, the AP-PCR method was used for the genotypic characterization of *P. intermedia* strains. In addition, the clinical samples with a positive result for culture of the *P. intermedia* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) method with a specie-specific *primer* and, after that, the PCR products were compared by the heteroduplex analysis. The results indicated that black-pigmented anaerobes were frequently cultured from periodontal diseased sites and *P. intermedia* were the most prevalent among the species recovered. Most of the subjects harbored between one to two distinct genotypes of *P. intermedia*, with a positive relation between numbers of genotypes and pocket probing depth. No matching of *P. intermedia* genotypes was observed between periodontal sites of the same individual. Interindividual genetic diversity has demonstrated absence of identical clones, indicating a high level of genetic diversity. The heteroduplex analyses of PCR products revealed that the majority of clinical samples harbored one to two clonal types, just like the AP-PCR technique. In conclusion, the subjects with periodontal disease harbored few clonal types and no identical genotypes between sites in the same individual and between individuals were found.

1. INTRODUÇÃO

A etiopatogenia da doença periodontal sempre foi alvo de muitos estudos, talvez devido a natureza multifatorial da doença. O período entre 1880 e 1920 foi considerado a “época de ouro da Microbiologia”, momento de descobertas de diversos agentes etiológicos de importantes infecções médicas. Na mesma época, surgiu grande interesse em investigar a etiologia da doença periodontal, sendo propostos quatro grupos distintos de microrganismos: ameba, espiroquetas, fusiformes e estreptococos, por aparente associação desses agentes com lesões periodontais. No entanto, as pesquisas no campo da Microbiologia bucal não foram tão bem sucedidas, como na Medicina. Isto se deve, possivelmente, à identificação de agentes etiológicos incorretos, aplicação de terapia inadequada, multiplicidade de doenças e ao surgimento de teorias concomitantes, levando ao desinteresse em estudar o papel das bactérias no desenvolvimento da periodontite (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994).

Durante a década de 50 e início dos anos 60, clínicos começaram a enfatizar a importância do controle da placa dental para tratamento adequado da doença periodontal. Em 1965, LÖE *et al.* realizaram uma pesquisa clássica intitulada “gengivite experimental em humanos”, demonstrando a íntima relação de causa e efeito entre o acúmulo de placa e a inflamação marginal dos tecidos periodontais e assim dando impulso à hipótese da placa inespecífica. Neste período, dava-se maior ênfase à similaridade de composição da placa entre indivíduos com e sem doença, considerando como alteração fundamental a quantidade total de microrganismos. Uma vez iniciada a destruição periodontal no

indivíduo, ela seria lenta, contínua e progressiva, associando-se a severidade da doença periodontal com o avanço da idade.

Paralelamente, a hipótese de infecção anaeróbia mista foi formulada. Segundo esta teoria qualquer combinação de espécies bacterianas que coletivamente apresentasse determinantes bioquímicos poderia levar à destruição periodontal. As infecções mistas investigadas incluíam infecções por fusiformes, espiroquetas e outras espécies, bem como infecções com presença predominante de membros do grupo *Bacteroides melaninogenicus* (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994).

Determinadas situações não conseguiam ser explicadas com base na teoria inespecífica, como a existência de indivíduos com grande quantidade de placa e inflamação gengival, mas sem desenvolver perda de suporte periodontal. Para esclarecer estes fatos até então obscuros, pesquisas foram elaboradas no intuito de melhor compreender o processo destrutivo da doença periodontal.

Estudos estruturais e da composição da placa de sítios de diferentes indivíduos revelaram microbiota relativamente simples, formada por cocos e bastonetes, associada com a saúde periodontal e microbiota distintamente diferenciada, associada com doença periodontal. O reconhecimento de diferenças na composição da placa bacteriana de indivíduo para indivíduo e entre sítios em um mesmo indivíduo levou a uma série de investigações na década de 70 (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994). Alguns estudos tentavam determinar se microrganismos específicos eram encontrados em sítios com lesão periodontal em comparação com áreas sadias do periodonto (SLOTS, 1976), enquanto outros investigavam microrganismos na placa subgengival de pacientes com diferentes

formas clínicas de doença periodontal (SLOTS, 1979). Estas pesquisas deram impulso ao estabelecimento da hipótese de placa específica, a qual teve repercussão imediata de impacto na prevenção e terapêutica da doença periodontal.

Há de se considerar que a microbiota bucal é bastante complexa. Encontrase mais de 500 espécies bacterianas distintas na cavidade bucal, muitas das quais nunca foram formalmente descritas. Todavia, pelo conhecimento atual, há indicações que certos complexos de microrganismos estão relacionados com as condições patológicas dos tecidos periodontais. Dentre estes, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) e *Treponema denticola* e o formado por *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e espécies do gênero *Fusobacterium* são considerados importantes na etiopatogenia das infecções periodontais (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

Um dos fatores mais consistentes associados com sinais de periodontite é a presença do grupo de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro, do qual fazem parte espécies do gênero *Porphyromonas* e *Prevotella*. Casos de periodontite do adulto são freqüentemente relacionados com o predomínio de *Porphyromonas gingivalis* nos sítios afetados. Enquanto a *Prevotella intermedia* está particularmente elevada na gengivite ulcerativa necrosante aguda e em certas formas de periodontite (MAEDA *et al.*, 1998).

No entanto, com o emprego de técnicas mais sensíveis, foi possível a detecção de periodontopatógenos em indivíduos sem doença periodontal (ASHIMOTO, 1996; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992). Esta observação promoveu vários questionamentos quanto a ecologia e estrutura natural da

população dessas espécies, de modo que apenas a identificação e quantificação de microrganismos não eram mais suficientes, tornando-se necessário o desenvolvimento de técnicas para estudar a diversidade genética dentro da espécie.

Existem evidências sugerindo que a maioria das doenças infecciosas bacterianas é causada por poucos clones de espécies patogênicas, com apenas um número limitado de cepas com capacidade de produzir infecções transmissíveis quando inoculadas em cultura pura, o que indica heterogeneidade de virulência dentro da espécie (BAKER *et al.*, 2000). Algumas cepas apresentam baixa virulência, são não invasivas e produzem infecções localizadas. Enquanto outras, são invasivas e causam lesões generalizadas, mas não letais (BAKER *et al.*, 2000; FRANDSEN *et al.*, 2001).

A investigação da diversidade genética de uma espécie promove e esclarece questionamentos importantes a respeito da história natural da infecção periodontal, os quais enquadram-se em três categorias inter-relacionadas: (1) a natureza do agente infeccioso, (2) a estrutura natural da população das espécies envolvidas e (3) aspectos epidemiológicos (MÉNARD & MOUTON, 1995).

Diversas técnicas de genotipagem têm sido desenvolvidas, dentre as quais a Reação em Cadeia da Polimerase com *Primer* Arbitrário (AP-PCR), um método com capacidade discriminatória, relativamente fácil e reproduzível para análise clonal de bactérias relacionadas com a doença periodontal (MÉNARD & MOUTON, 1995).

No entanto, os métodos aplicados para estudar a genotipagem de uma espécie, incluindo AP-PCR, necessitam do cultivo microbiano prévio para

isolamento da bactéria a ser estudada, isto representa uma etapa laboratorial onerosa e exaustiva, com a possibilidade da introdução de um resultado tendencioso devido à análise de apenas cepas predominantes ou mais facilmente cultiváveis. Pelo exposto, parece ser ideal o desenvolvimento e aplicação de técnicas capazes de identificar múltiplas cepas diretamente da amostra clínica. A análise heteroduplex de produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi aplicada por LEYS *et al.* (1999) para identificar múltiplas cepas de *Porphyromonas gingivalis* diretamente de amostras clínicas de placa subgengival, mostrando ser um método rápido, sensível e sem a necessidade de cultivo microbiano prévio.

Apesar da inegável relação da presença de *Prevotella intermedia* e a etiopatogenia da doença periodontal, justificada pela presença de fatores de virulência, existe pequeno número de estudos a respeito da diversidade genética dessa espécie em indivíduos com doença periodontal destrutiva. Justificando a necessidade de mais estudos para investigar a estrutura da população de *Prevotella intermedia*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos Taxonômicos

Em 1921, OLIVER & WHERRY isolaram bastonetes anaeróbios estritos, Gram negativos, não móveis, sacarolíticos que produziam colônias negras em placas de ágar-sangue. Acreditando que o pigmento fosse melanina deram o nome de *Bacterium melaninogenicus* aos microrganismos, posteriormente incluídos no gênero *Bacteroides*.

Com base na capacidade de fermentar carboidratos demonstrada por isolados de *Bacterium melaninogenicus*, SAWYER, MACDONALD & GIBBONS, em 1962, os dividiram em: não fermentadores, fracos fermentadores e fortes fermentadores.

A capacidade de fermentar carboidratos serviu de fundamento para FINEGOLD & BARNES, em 1977, classifica-los em *Bacteroides melaninogenicus* subespécie *asaccharolyticus*, *Bacteroides melaninogenicus* subespécie *intermedius* e *Bacteroides melaninogenicus* subespécie *melaninogenicus*.

Apenas em 1982, estas sub-espécies foram elevadas para categoria de espécies em pesquisa de MAYRAND & HOLT.

Em 1988, SHAH & COLLINS indicaram um novo gênero, *Porphyromonas*, no qual as espécies assacarolíticas do gênero *Bacteroides* foram incluídas. Os mesmos autores, em 1990, criaram o gênero *Prevotella*, composto de espécies

sacarolíticas, pigmentadas e não pigmentadas. Este gênero inclui a espécie *Prevotella intermedia*.

Em relação a *P. intermedia*, foi observada heterogeneidade intra-espécie em estudos feitos por JOHNSON & HOLDEMAN, em 1983, que com base na homologia de DNA encontraram dois grupos distintos para a bactéria: VPI 4197 e 8944. No mesmo ano, GMÜR & GUGGENHEIM dividiram a espécie *P. intermedia* em três sorogrupos (I, II e III).

Em 1992, um estudo abrangente realizado por SHAH & GHARBIA, utilizando a técnica de hibridização DNA-DNA, propôs a classificação deste microrganismo em duas genoespécies, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, representadas pelas cepas-tipo ATCC 25611 e a ATCC 33563, respectivamente.

A detecção de isolados bacterianos anaeróbios, Gram negativos, pigmentados, moderadamente sacarolíticos, indol positivos e bioquimicamente mais relacionados à *P. intermedia* e *P. nigrescens*, mas não tipados como nenhuma delas, levou KÖNÖNEN *et al.*, em 1998, a inicialmente sugerir, e depois, a partir de resultados filogenéticos, propor uma nova espécie dentro do gênero *Prevotella*, a *P. pallens*, cuja cepa-tipo é a NCTC 13042.

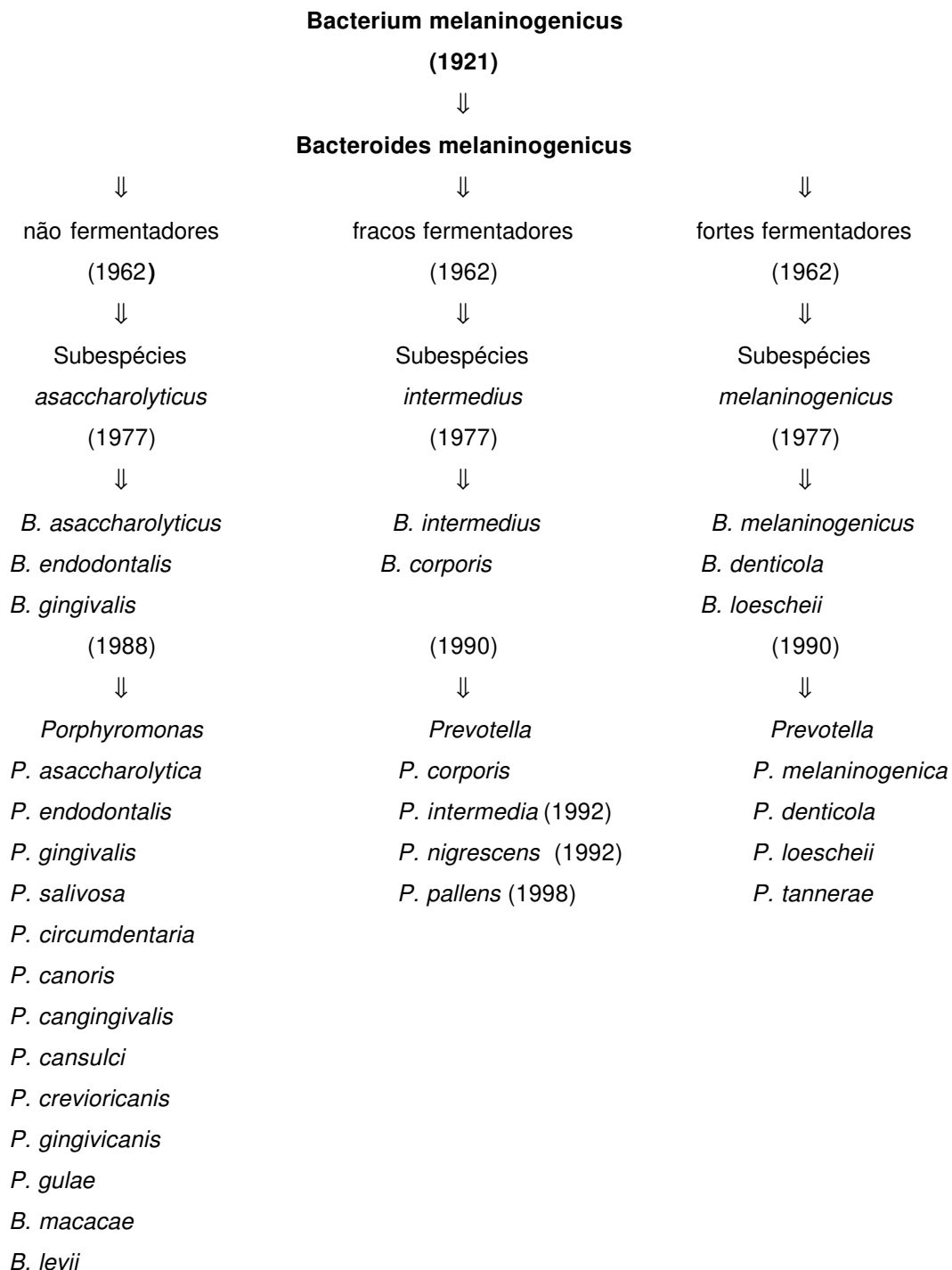


FIGURA 1- Evolução da taxonomia dos bastonetes Gram-negativos anaeróbios formadores de colônias negras (JOUSIMIES-SOMER, 1995; KÖNÖNEN *et al.*, 1998, FOURNIER *et al.*, 2001)

2. 2. Anaeróbios pigmentados negros e a doença periodontal

A periodontite é uma doença que afeta os tecidos de suporte dos dentes, sendo caracterizada por perda de inserção periodontal, incluindo o osso alveolar. A etiologia da doença é multifatorial, sendo que a biofilme microbiano desempenha uma função essencial na etiopatogênese das infecções periodontais (LAMONT & JENKINSON, 1998). Dentre as inúmeras espécies bacterianas isoladas do biofilme associado a periodontite, as espécies constituintes do grupo de bastonetes Gram-negativos anaeróbios produtores de pigmento negro mostram-se fortemente relacionadas com infecções periodontais destrutivas (SLOTS, 1979; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992). Com o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo permitindo o isolamento de microrganismos anaeróbios e com a introdução de técnicas de biologia molecular, surgiram inúmeras pesquisas interessadas na relação da presença de pigmentados negros com quadros de doença periodontal destrutiva.

Como estudos epidemiológicos feitos em vários países em desenvolvimento demonstraram que a porcentagem dos adultos atingida por doença periodontal destrutiva é a mesma vista em adultos de países industrializados, apesar da pior higiene bucal, McNABB *et al.*, em 1992, procuraram estudar a distribuição de patógenos em um grupo de imigrantes de dez países subdesenvolvidos, na Suíça, constituído por trinta homens entre 35 e 44 anos de idade, utilizando métodos de cultivo bacteriano. De acordo com o aumento da profundidade de sondagem, a maior frequência de detecção foi de *P. intermedia*, variando de 90,4% a 100%, seguida da espécie *P. melaninogenica*

com frequência entre 42,9% e 33,3% e ainda a *P. gingivalis* foi detectada em sítios com evidente destruição periodontal (66,7%), mas também sítios com mínima doença periodontal e sem recessão gengival mostraram frequência de detecção relativamente alta (34,1%).

DAHLÉN *et al.*, em 1992, avaliaram a ocorrência de patógenos periodontais em 31 indivíduos quenianos com e sem doença periodontal, com idades variando de 19 a 35 anos. As amostras foram obtidas do sulco gengival e bolsa periodontal e analisadas por cultura para diversos patógenos, entre eles *P. gingivalis*, *B. intermedius* e grupo de *B. melaninogenicus*, os quais foram detectados, respectivamente, em 79%, 86% e 14% dos sítios testes (perda de inserção $\geq 5\text{mm}$; bolsa $\geq 4\text{mm}$) e, em 36%, 86% e 21% dos sítios controles (perda de inserção $\leq 2\text{mm}$ e bolsa $\leq 3\text{mm}$) nos indivíduos com periodontite, enquanto no grupo sadio a detecção positiva dessas espécies foi de 18%, 47% e 0%, respectivamente. Portanto, espécies de pigmentados negros foram mais freqüentemente detectadas no grupo com periodontite comparados ao grupo sem doença, mas a *P. gingivalis* foi o único microrganismo que indicou diferença entre sítios com perda periodontal e sadios, assim como, entre indivíduos. Os autores chamam a atenção para o inadequado padrão de higiene bucal apresentado pela população estudada, favorecendo o estabelecimento de periodontopatógenos mesmo em sítios com bolsas periodontais rasas.

Usando a técnica do Slot Immunoblot (SIB), RUBIRA, em 1994, analisou amostras de placa subgengival de 10 indivíduos com periodonto saudável, entre 18 e 36 anos de idade, e de 27 portadores de periodontite quanto à presença de

dez bactérias, entre as quais, periodontopatógenos. No grupo sadio a prevalência de indivíduos com pelo menos um sítio positivo a um periodontopatógeno variou de 50 a 100%. A porcentagem de sítios positivos foi de 45% para *P. intermedia/nigrescens* e 40% para a *P. gingivalis*. As diferenças entre o grupo sadio e o com periodontite ocorreram por conta das médias dos escores de detecção, que foram, respectivamente $1,5 \pm 0,6$ e $2,6 \pm 0,4$, para *P. gingivalis* e $1,6 \pm 0,5$ e $2,5 \pm 0,4$, para *P. intermedia/nigrescens*.

A incidência relativa de *P. intermedia* e *P. nigrescens*, bem como de outros bacteroides formadores de colônias negras em sítios ativos, inativos e saudáveis de indivíduos com periodontite e em sítios subgengivais de indivíduos com periodonto sadio foi analisada por TEANPAISAN; DOUGLAS & WALSH (1995), em 58 indivíduos (46 com periodontite e 12 com periodonto sadio). Um total de 138 sítios (48,2%) apresentou pigmentados negros, dos quais 64% eram sítios ativos, 35,7%, inativos e 38,5% sítios sadios de indivíduos com periodontite e 50% eram sítios do grupo sadio. A *P. gingivalis* foi isolada mais freqüentemente de sítios ativos (11%), mas também ocorreu em sítios sadios (5%) no grupo com periodontite. No entanto, não foi detectada em indivíduos com periodonto normal. As incidências de *P. intermedia* e *P. nigrescens* nos sítios ativos, inativos e sadios dos pacientes foram respectivamente de 15,5% e 37,7%; 0% e 18,6% e, 20,5% e 11,5% e no total de sítios dos indivíduos com periodonto sadio, 18,3% e 31,6%. Segundo os autores, essas espécies, diferentemente da *P. gingivalis* parecem ser comensais comuns, mas podem agir como patógenos oportunistas.

A prevalência de diversos patógenos periodontais, entre eles *P. gingivalis* e *P. intermedia*, foi determinada em amostras subgengivais de 50 indivíduos com periodontite avançada (17 a 75 anos) e 50 adultos (21 a 36 anos) e 50 crianças com gengivite (2 a 11 anos) por ASHIMOTO *et al.*, em 1996, usando como método de detecção a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) baseada no RNAr 16S. A prevalência em indivíduos com periodontite e em adultos e crianças com gengivite, respectivamente, foi de 70%, 10% e 14% para *P. gingivalis*, 58%, 12% e 18% para *P. intermedia*. A porcentagem de sítios colonizados por esses patógenos foi de 22% ou menos em adultos e crianças com gengivite, sugerindo que estes microrganismos não são componentes importantes da microbiota subgengival de pacientes sem periodontite. O método de detecção por PCR foi mais sensível que a cultura e exibiu menor reatividade cruzada que a sonda de DNA.

A incidência de bacteroides produtores de pigmento negro, especialmente *P. intermedia* e *P. nigrescens*, foi objeto de estudo de MAEDA *et al.*, em 1998. Um total de 60 indivíduos foi incluído na pesquisa, sendo dividido em dois grupos: um formado por 45 indivíduos com periodonto saudável ($\pm$ 21,1 anos) e outro, constituído por 15 pacientes com periodontite ($\pm$ 51,3 anos). Os bacteroides negros foram isolados em 71,1% dos indivíduos saudáveis e nos pacientes com periodontite foram detectados em 47,1% (16/34) dos sítios sadios e 87,8% (36/41) dos sítios ativos. A *P. gingivalis* foi isolada apenas em sítios ativos do grupo com periodontite, enquanto a *P. intermedia* foi predominante em sítios ativos e sadios (37,7% e 41,7%, respectivamente) deste grupo, e encontrada em 16,8% dos indivíduos sem doença. A *P. nigrescens* foi predominante em indivíduos com

periodonto saudável (70,5%) e detectada em 19,6% e 21,1% respectivamente dos sítios sadios e sítios ativos dos pacientes. As espécies *P. melaninogenica*, *P. loeschii* e *P. denticola* revelaram, respectivamente, a prevalência de 2,3%, 1,7% e 1,7%, em sítios ativos e 3,3%, 5,9% e 9,8%, em sítios sadios e, ainda, 1,7%, 0% e 8,1% no grupo sem doença.

O padrão de distribuição de *P. gingivalis* e *P. intermedia/nigrescens* após terapia periodontal (raspagem e alisamento radicular e retalho modificado de Widman) foi demonstrado por MOMBELLI *et al.* (em 2000), em 17 pacientes com periodontite, que tiveram amostras de placa subgengival colhidas de todos os dentes. As duas espécies de microrganismos apresentaram diferentes padrões de persistência. A *P. gingivalis* foi detectada em 59% dos indivíduos, mas em baixa proporção nos sítios (5,4%). A *P. intermedia/nigrescens* mostrou forte relação em sítios com sangramento, não sendo detectada em um único indivíduo, com 40,6% dos sítios positivos para essa espécie. Os autores concluíram que se após o tratamento mecânico padrão, um grande número de sítios continuar a sangrar, pode-se esperar número elevado de sítios positivos para *P. intermedia/nigrescens* e se muitas bolsas profundas persistirem, um maior número de sítios *P. gingivalis*-positivos.

Utilizando técnicas de cultivo microbiano, van WINKELHOFF *et al.*, em 2002, investigaram a presença de patógenos periodontais suspeitos em 116 pacientes com destruição periodontal ($\pm$ 42,4 anos) e em 94 indivíduos sem doença ($\pm$ 40,4 anos). A prevalência de indivíduos para a presença de *P.*

gingivalis e *P. intermedia* foi, respectivamente, 59,5% e 10,6% no grupo sem doença e, 87,9% e 69,1% no grupo com doença periodontal. Segundo os autores, os resultados demonstraram que periodontopatógenos como *P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *P. micros* são fortes marcadores de doença periodontal destrutiva.

SOCRANSKY, SMITH & HAFFAJEE, em 2003, investigaram os perfis microbiológicos relacionados com periodontite refratária, por meio da técnica de hibridização checkerboard DNA-DNA. A análise microbiológica revelou quatro diferentes perfis: **perfil I** caracterizado por altas proporções de espécies bacterianas do complexo amarelo e verde, **perfil II** constituído por pequeno número e alta proporção de espécies do complexo laranja e lilás, **perfil III** demonstrou elevado número de A.a. e espécies do complexo lilás e por último, o **perfil IV** com alta proporção de espécies do complexo vermelho e laranja. Os autores enfatizam a presença do complexo laranja e vermelho em casos de periodontite refratária, nos quais as espécies *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* estão incluídas e mostram-se fortemente relacionadas com parâmetros clínicos periodontais, como perda de inserção e sangramento gengival à sondagem.

2. 3. Análise genotípica de anaeróbios pigmentados negros

Existem evidências sugerindo que a maioria das doenças infecciosas bacterianas é causada por poucos clones de espécies patogênicas (FRINLAY & FALKOW, 1989). Então, nem todas as cepas que constituem uma espécie

bacteriana patogênica parecem ser igualmente virulentas. O que poderia explicar a identificação de *P. gingivalis* e *P. intermedia* na cavidade bucal de indivíduos com saúde periodontal, apesar da inegável associação desses patógenos com a destruição dos tecidos periodontais.

SOCRANSKY & HAFFAJEE, em 1992, especularam que tipos clonais específicos de bactérias periodontopatogênicas poderiam ser responsáveis pela progressão da doença periodontal, de modo que as cepas encontradas em sítios saudáveis podem representar clones relativamente não virulentos.

Para determinar se duas cepas bacterianas são idênticas ou não, são necessárias comparações de características fenotípicas e/ou genotípicas. Um método de genotipagem de cepas bacterianas é comumente referido como *fingerprinting* de DNA cromossômico (“impressão digital” do DNA) (LI & CAUFIELD, 1998).

Uma vez a diversidade genética entre isolados é o reflexo da diferença seqüencial dos cromossomos, métodos moleculares de tipagem, tais como análise de restrição endonuclease (REA), técnica de polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição (RFLP), técnica de eletroforese de isoenzimas (MLEE) e de campo pulsado (PFGE), reação em cadeia da polimerase com primer arbitrário (AP-PCR) e análise heteroduplex parecem ser métodos com maior poder discriminatório e confiabilidade para caracterização genética de diferentes cepas de periodontopatógenos, quando comparados aos métodos tradicionais baseados na mensuração de propriedades fenotípicas (ÖZMERİC *et al.*, 2000).

No presente estudo duas técnicas foram utilizadas para estudar a diversidade genética de *P. intermedia*, AP-PCR e análise heteroduplex do produto amplificado pela reação em cadeia da polimerase.

A técnica de AP-PCR ou RAPD foi desenvolvida simultânea e independentemente por dois grupos de pesquisa (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990). Os dois termos são amplamente aplicados, sendo que RAPD significa “DNA polimórfico amplificado ao acaso” (*random amplified polymorphic DNA*) e AP-PCR, “reação em cadeia da polimerase com *primer* arbitrário” (*arbitrarily primed polymerase chain reaction*). Na técnica de AP-PCR, um *primer* de sequência arbitrária se liga a sítios alvos inespecífico do DNA genômico sob condições que permitam o pareamento de bases. As regiões de DNA unidas ao *primer* são subseqüentemente amplificadas pela reação em cadeia da polimerase e usadas como marcadores polimórficos. A principal vantagem da AP-PCR consiste na sua habilidade de proporcionar perfis de DNA altamente específicos sem nenhum conhecimento prévio da sequência do material genético (MÉNARD & MOUTON, 1995).

Com a análise heteroduplex de produtos amplificados pela reação em cadeia da polimerase, fragmentos similares, mas não idênticos de DNA podem ser discriminados por eletroforese em gel de poliácridamida. Os fragmentos de DNA amplificados são submetidos à temperatura elevada para separar a dupla fita de DNA e, em seguida, o produto amplificado é resfriado para haver o *reannealing* das bandas de DNA. Quando as seqüências de DNA são perfeitamente complementares forma-se um homoduplex (uma única banda no gel de poliácridamida), mas quando existem áreas não complementares a formação de

heteroduplexes pode ser observada como bandas adicionais que migram mais lentamente na eletroforese em gel de poliacrilamida (LEYS *et al.*, 1999; TURNER *et al.*, 2002; PINAR *et al.*, 2002)

Utilizando enzimas de restrição (REA), LOSS *et al.*, em 1990, caracterizaram 33 cepas laboratoriais de *P. gingivalis* isoladas de sítios com periodontite e infecção endodôntica, em diferentes localizações geográficas. De modo geral, cada isolado apresentou um padrão genético único, isto indica que existe considerável diversidade genética na população global de *P. gingivalis*. Por outro lado, alguns *fingerprints* idênticos foram observados, como exemplo, entre os isolados CLN16-6-4 e A7A1-28, os quais foram coletados de diferentes indivíduos da comunidade indígena no estado do Arizona-EUA, onde há uma tribo isolada e homogênea de americanos nativos, fato que pode explicar a diversidade local limitada dessa espécie.

Ao investigar a ocorrência de infecção cruzada de periodontopatógenos entre estudantes com perda de inserção, de uma mesma escola, van STEENBERGEN *et al.*, em 1991, por meio da técnica de REA, observaram que todos os isolados de *P. intermedia* e *P. gingivalis* apresentaram diferentes padrões de digestão enzimática, entre os indivíduos. Com relação a *P. intermedia*, três estudantes apresentaram essa espécie no dorso da língua e em bolsa periodontal, sendo que em dois voluntários o padrão de REA entre os sítios foi idêntico. Os achados mostraram ausência de transmissão horizontal entre os estudantes, segundo os autores pode ser argumentado o pequeno número de isolados testados (± 10 isolados/voluntário). Contudo, os diferentes isolados de uma

espécie detectados em dois diferentes sítios mostraram ser idênticos, sugerindo que um isolado deve representar a cepa predominante que coloniza o sítio de isolamento.

Em 1994, KÖNÖNEN *et al.* analisaram a transmissão de *P. melaninogenica* entre mães e filhos com 4 a 32 meses de idade. Os isolados foram obtidos de diferentes sítios da cavidade bucal da criança e de amostras salivares da mãe e, então, submetidos a genotipagem por meio da análise de enzima de restrição que detectou 101 ribotipos distintos, o que indicou extensa heterogeneidade genética entre os 248 isolados de *P. melaninogenica* tipados. Mães e filhos abrigavam mais de sete ribotipos, os quais eram diferentes entre indivíduos não relacionados. Por outro lado, padrões REA idênticos foram encontrados entre mãe e filhos, reforçando a saliva materna como fonte de transmissão, mas também a criança apresentava ribotipos exclusivos, o que indica que outras fontes, além da materna, influenciam na colonização de crianças.

TEANPAISAN *et al.*, em 1996, investigaram a relação entre genótipos de anaeróbios de pigmento negro e o padrão de doença de sítios periodontais, por meio das técnicas de REA e ribotipagem. A genotipagem de 65 isolados *P. gingivalis* e 119 de *P. intermedia* provenientes de voluntários com e sem periodontite demonstrou que os indivíduos abrigaram de 1 a 2 genótipos distintos, enquanto que para *P. nigrescens* o número de genótipos por paciente foi de 1 a 4, sendo que nove pacientes abrigaram mais de um clone. Entre indivíduos, diferentes padrões de ribotipos e de REA foram encontrados e genótipos idênticos colonizaram sítios com e sem destruição periodontal em um mesmo indivíduo,

portanto nenhuma relação foi estabelecida entre tipo clonal e padrão clínico do sítio periodontal.

MÄTTÖ *et al.*, em 1996 a, pesquisaram a distribuição e a análise genética de *P. intermedia* e *P. nigrescens* em 53 indivíduos ($\pm$ 47 anos), com o diagnóstico de doença periodontal ausente (n=10), doença periodontal inicial (n=23) e destruição periodontal avançada (n=20). O número de isolados analisados pela técnica da ribotipagem foi de 68 isolados de *P. intermedia* (11 voluntários) e 81 isolados de *P. nigrescens* (15 voluntários), resultando no total 25 ribotipos: dez ribotipos de *P. intermedia* e 15 de *P. nigrescens*. Todos os voluntários abrigavam de 1 a 2 ribotipos, independente da espécie. A análise entre indivíduos não relacionados, indicou a presença de apenas um ribotipo idêntico, para ambas espécies. De maneira que, os resultados indicaram que a diversidade genética intra e interindivíduo encontrada nas espécies *P. intermedia* e *P. nigrescens* foi semelhante.

Empregando outro método de genotipagem, a técnica de AP-PCR, MÄTTÖ *et al* b., no mesmo ano, investigaram a similaridade genética de isolados de *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Amostras de placa subgengival e de saliva foram obtidas de 40 indivíduos com diferentes padrões de saúde periodontal, dos quais 16 foram positivos para presença das espécies investigadas. O total de 128 isolados de *P. intermedia* e *P. nigrescens*, 4 salivares e 4 subgengivais por voluntário, foi submetido à análise clonal por AP-PCR utilizando dois *primers* arbitrários, OPA-13 e OPA-03. A análise com o primer OPA-13 revelou quatro

fingerprints entre 37 isolados de *P. intermedia* de sete indivíduos e, seis, de 91 isolados de *P. nigrescens* obtidos de 14 voluntários. Entre indivíduos não relacionados, apenas um padrão AP-PCR de *P. intermedia* foi comum entre quatro voluntários e para *P. nigrescens* dois perfis idênticos foram identificados. A análise com *primer* OPA- 03 revelou maior diversidade genética, sendo 5 perfis eletroforéticos de *P. intermedia* e 17 perfis de *P. nigrescens*; com exceção de dois indivíduos, todos os outros padrões genéticos foram únicos. O somatório de 5 tipos eletroforéticos de *P. intermedia* e 18 de *P. nigrescens* foi obtido quando os resultados com ambos os *primers* foram combinados. Na análise intraindivíduo, foi encontrado 1 genótipo de *P. intermedia* e de 1 a 3 genótipos de *P. nigrescens* e similaridade genética entre os dois sítios de isolamento foi detectada em 15 dos 16 participantes da pesquisa.

A distribuição e rotas de transmissão de *P. intermedia* e *P. nigrescens* entre membros familiares foram investigadas por van STEENBERGEN *et al.*, em 1997. Amostras de placa subgengival, saliva, tonsilas, língua e mucosa bucal de sete pacientes com periodontite, de suas esposas e filhos foram analisadas por cultura. A *P. intermedia* foi detectada em todos os pacientes, em quatro esposas e em três crianças, enquanto a *P. nigrescens* foi presente em apenas dois pacientes, em cinco esposas e na maioria das crianças. A genotipagem revelou que isolados de indivíduos não relacionados sempre apresentaram ribotipos diferentes, enquanto ribotipos idênticos de *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram encontrados entre os casais e entre pais e filhos, caracterizando transmissão horizontal e vertical, respectivamente.

GONÇALVES, ROBITAILLE & MOUTON, em 1999, pesquisaram a ocorrência simultânea de tipos clonais idênticos de *P. gingivalis* e *P. nigrescens* em canais radiculares e placa subgengival. Para desenvolver a pesquisa, amostras de placa subgengival e de canais radiculares infectados foram obtidas de dez pacientes e submetidas ao cultivo para isolamento de anaeróbios de pigmento negro. O total de 17 isolados de *P. gingivalis* e 9 isolados de *P. nigrescens* foi obtido. A técnica de AP-PCR, aplicada para pesquisar a diversidade genética dos isolados, revelou a presença de *P. gingivalis* ou *P. nigrescens* simultaneamente no sistema de canais radiculares e na placa subgengival de quatro pacientes. Observaram também que para cada paciente, apenas um único e exclusivo perfil eletroforético de *P. gingivalis* e *P. nigrescens* foi encontrado, independente do sítio de isolamento. Os resultados indicam que a cavidade bucal foi colonizada por um tipo clonal e o fato dos perfis AP-PCR serem únicos para cada indivíduo reforça que a estrutura populacional das espécies consiste de tipos clonais múltiplos conferindo ao taxon um alto nível de diversidade genética.

Utilizando a análise heteroduplex de produtos de PCR para detectar diferentes tipos clonais de *P. gingivalis* presentes em amostras de placa subgengival de 661 voluntários com história clínica de periodontite inicial a moderada, LEYS *et al.*, em 1999, identificaram 22 distintos tipos heteroduplex de *P. gingivalis*, porém estreitamente relacionados. Na população estudada, a maioria das amostras clínicas apresentava não mais que duas cepas, sendo raro a detecção de amostras com mais de três tipos clonais distintos.

FUKUI *et al.*, em 1999, estabeleceram um sistema de tipagem para *P. intermedia* e *P. nigrescens* combinando a ribotipagem e AP-PCR para estudar a incidência intra-familiar dessas espécies na cavidade bucal. Foram selecionados seis pacientes com suas esposas e um filho, totalizando 18 indivíduos, os quais apresentavam periodontite em estágio inicial a moderada ou apenas gengivite. Todos os voluntários foram positivos para a presença das duas espécies bacterianas, obtendo 115 isolados de *P. intermedia* e 178 de *P. nigrescens*. Os resultados indicaram que entre indivíduos de uma mesma família, o mesmo padrão de genótipos foi encontrado, fato não observado entre indivíduos não relacionados e ainda, a espécie *P. nigrescens* revelou oito diferentes tipos eletroforéticos detectados nos 14 voluntários positivos, enquanto a genotipagem da espécie *P. intermedia* indicou apenas três diferentes genótipos em 11 indivíduos positivos.

Em 2001, TEANPAISAN, DOUGLAS & NITTAYANANTA pesquisaram o isolamento e a genotipagem de pigmentados negros provenientes de sítios periodontais de 50 pacientes HIV positivos e de 50 indivíduos não infectados. A análise clonal de 46 isolados de *P. gingivalis*, por meio da reação em cadeia da polimerase de seqüências palindrômicas extragênicas repetitivas (REP-PCR), demonstrou que todos os voluntários abrigavam apenas 1 tipo de genótipo e apenas 2 pacientes infectados compartilhavam o mesmo genótipo. O total de 161 e 123 isolados clínicos de *P. intermedia* e *P. nigrescens*, respectivamente, foram obtidos e analisados pela técnica de AP-PCR (OPA-03, OPA-13 e L-10), revelando que, independente do diagnóstico de contaminação por HIV, os

voluntários abrigaram de 1 a 2 tipos de genótipos; em seguida a análise intraindivíduo não indicou a presença de genótipos idênticos entre os voluntários, demonstrando ampla heterogeneidade genética na população de *P. intermedia*.

3. Proposição

Com base nos poucos relatos existentes na literatura sobre a diversidade genética de *P. intermedia*, este trabalho propôs-se avaliar:

1. Por meio da técnica de cultura microbiana, a prevalência e frequência de detecção de espécies de anaeróbios pigmentados negros em indivíduos com doença periodontal e a correlação dessas espécies com parâmetros clínicos periodontais;
2. A heterogeneidade genética da espécie *P. intermedia*, intra e interindivíduos com doença periodontal, por meio de duas técnicas, AP-PCR e análise heteroduplex de produtos amplificados por PCR.

4. METODOLOGIA

Este estudo foi conduzido de acordo com os preceitos determinados pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde publicada em 10 de outubro de 1996, e considerado aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, conforme cópia do parecer no **ANEXO 1**.

4.1 . Seleção dos voluntários

Cada voluntário recebeu um termo de informação e consentimento elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, e somente após a anuência do voluntário, por meio da assinatura do termo, este foi considerado participante da pesquisa.

Para participar da pesquisa os voluntários tiveram que preencher os seguintes critérios de inclusão:

- boa saúde geral;
- não realização de antibioticoterapia e de tratamento periodontal nos últimos três meses;
- apresentar no mínimo vinte dentes;
- ausência de gravidez.

4.2. Avaliação dos voluntários

Para cada voluntário selecionado foram anotados dados pessoais, história médica significativa, profundidade de sondagem dos sítios subgengivais selecionados para a colheita microbiológica e presença de sangramento à sondagem pelo método dicotômico (presente ou ausente).

O exame clínico e a colheita microbiológica foram realizados em pacientes da clínica de graduação, da especialização e do setor de triagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, utilizando espelho bucal, sonda periodontal milimetrada com marcação tipo Williams e pontas de papel absorvente (# 35 - 55) esterilizados, juntamente com materiais descartáveis.

4.3. Colheita da amostra subgengival para análise microbiológica

Para a colheita, inicialmente os locais foram isolados com gaze e a placa supragengival foi cuidadosamente removida com bolinhas de algodão com o intuito de evitar contaminação da amostra subgengival (**FIGURA 2**). Em seguida, de duas a três pontas de papel absorvente foram introduzidas, por trinta segundos, em cada sítio periodontal selecionado para obtenção da placa subgengival (**FIGURA 3**).

De cada voluntário foram colhidas amostras de placa subgengival de bolsas periodontais, com ou sem sangramento à sondagem. No mesmo indivíduo, foram selecionadas áreas com profundidade de sondagem de até 3mm de profundidade, sem sangramento. Foi feito um *pool* das amostras de todos os sítios de bolsa

periodontal e outro, das amostras dos sítios saudáveis para subsequente análise laboratorial.

Logo após o término da colheita microbiológica, as pontas de papel absorvente, com a placa subgengival, foram depositadas no interior de tubos *ependorf* contendo 1mL de solução de transporte reduzida (SYED & LOESCHE, 1972) que, por sua vez, foram devidamente codificados e armazenados na geladeira de transporte em banho de gelo e imediatamente transportados ao laboratório da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, num período máximo de 1 hora.



FIGURA 2- Remoção da placa supragengival



FIGURA 3- Colocação da ponta de papel absorvente para colheita da placa subgengival

4.4 . Inoculação e Incubação

Com o propósito de formar uma suspensão bacteriana uniforme, as amostras microbiológicas iniciais foram agitadas mecanicamente por 30 segundos. Em seguida, as suspensões foram diluídas em série decimais de 10^{-1} a 10^{-4} , em meio de transporte reduzido. Na etapa seguinte, procedeu-se a

inoculação das amostras. Alíquotas de 20 µL das duas últimas diluições (1:1000 e 1:10000) foram inoculadas em placas de Petri descartáveis contendo 20 mL de meio de cultura ágar-sangue pré-reduzido suplementado com hemina (5µg/mL), vitamina K (1µg/mL) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro, específico para o crescimento de bactérias formadoras de colônias negras. Todo o experimento foi realizado em duplicata e os meios de cultura semeados foram incubados a 37°C em ambiente de anaerobiose, por cinco a sete dias.

Para obtenção do ambiente de anaerobiose, utilizou-se jarra de anaerobiose de acrílico transparente, com capacidade de 2,5L (Probac do Brasil®), contendo no interior de cada jarra, dois geradores de anaerobiose (Anaerogen – Oxoid®), um indicador de anaerobiose (Oxoid®) e também sílica para absorção da umidade.

Imediatamente após a diluição, as colheitas microbiológicas iniciais foram congeladas a -70°C , com o objetivo de pesquisas futuras.

4.5. Isolamento e identificação microbiana

As placas de ágar-sangue com crescimento microbiano foram analisadas em lupa estereoscópica com aumento de 3 vezes. Cada uma das colônias que se apresentaram com pigmento negro ou marrom escuro foram estriadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura ágar-sangue pré-reduzido suplementado com hemina (5µg/mL), vitamina K (1µg/mL) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro com adição de kanamicina e vancomicina (meio de

cultura seletivo) e incubadas em ambiente de anaerobiose a 37°C, com o intuito de obtenção de cultura pura (**FIGURA 4** e **FIGURA 5**).

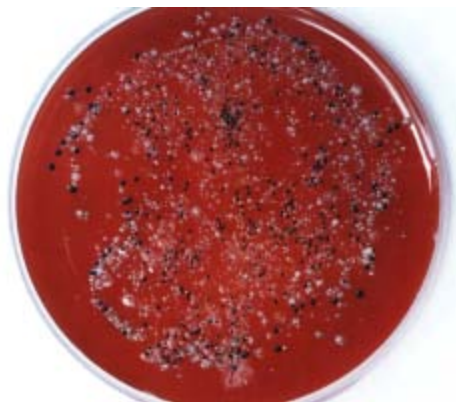


FIGURA 4- Após o período de incubação, com crescimento de colônias de pigmento negro

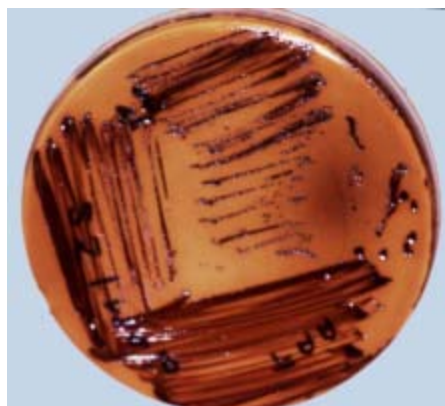


FIGURA 5- Obtenção de cultura pura de bastonete Gram-negativo produtor de pigmento negro

As culturas puras foram inicialmente identificadas de acordo com o método de coloração de Gram.

Em culturas puras de bastonetes Gram-negativos foram realizados os seguintes teste de identificação:

- Fluorescência das colônias sob luz UV com 360nm de comprimento de onda (**FIGURA 6, 7**). Em casos de fluorescência negativa, a confirmação foi realizada por meio da utilização de metanol colocado em contato com o microrganismo;
- Fermentação de lactose utilizando o substrato 4-metilumbeliferil-b-D-galactosidase – MUG (SIGMA®) (ALCOFORADO *et al.*, 1987);
- Atividade da tripsina utilizando o composto sintético fluorogênico L-arginina 7- amino -4- metilcoumarina amido HCl - CAAM (SIGMA®) (**FIGURA 8**) (SLOTS, 1987).

Para aplicação dos testes descritos, alíquotas de 20µL das soluções de metanol, MUG e CAAM foram dispensadas em placas de microtitulação contendo 96 poços, posteriormente as colônias de pigmentação negra foram colocadas em contato com as soluções, com auxílio de uma alça de platina, para análise sob luz UV 360nm

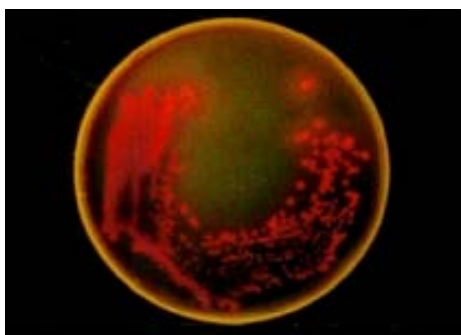


FIGURA 6- Fluorescência das colônias de *P. intermedia* sob luz UV360nm



FIGURA 7- Aparelho utilizado para o teste da fluorescência

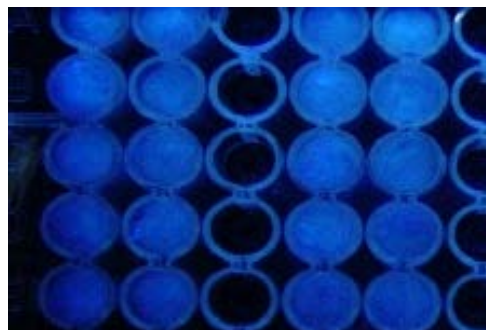


FIGURA 8- Placa de microtitulação contendo CAAM sob luz UV.

Para diferenciar as espécies *P. intermedia* e *P. nigrescens* a amplificação de uma seqüência específica de DNA por PCR foi aplicada.

Para a reação de PCR foram utilizados pares de *primers* espécie específico para identificação de *P. intermedia* e *P. nigrescens* listados na **TABELA 1**.

TABELA 1- *Primers* utilizados para identificação de *P. intermedia* e *P. nigrescens* pela técnica de PCR (STUBBS *et al.*, 1999)

Espécie	Primer: Seqüência	Região	Posição
<i>P. intermedia</i>	5'CAAAGATTCATCGGTGGA3'	16S	296bp
	5'GCCGGTCCTTATTCGAAG3'	rRNA	
<i>P. nigrescens</i>	5'CAAAGGTTTTCCGGTAAG3'	16S	291bp
	5'GCCGGTCCTTATTCATGA3'	rRNA	

A especificidade dos *primers* utilizados foi testada frente a um painel de microrganismos para verificar possível reação cruzada. Estes microrganismos incluem: *Porphyromonas gingivalis* 11, *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406,

Prevotella intermedia HG110, *Prevotella nigrescens* ATCC 25261, *Prevotella oralis* ATCC332, *Porphyromonas asaccharolyticus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

A reação de PCR foi processada em 25µL de uma mistura de reagentes contendo 1X solução tampão (10X Reaction Buffer Taq Polymerase, INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP (DNA Polymerization Mix; INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), 0,4 µM de cada *primer*, 1,5 U de *Taq* DNA polymerase (INVITROGEN® – Life Technology do Brasil) e uma alíquota de 2,5µL de cada amostra de DNA (50ng/µL). Além das amostras, em cada reação de PCR, foi utilizado um controle positivo da espécie pesquisada e outro negativo (água bi-destilada e deionizada).

Esta mistura reagente foi submetida a um aparelho termociclador convencional (GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer) programado para o seguinte ciclo:

- *P. intermedia* e *P. intermedia*: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, seguida de trinta ciclos de desnaturação a 94°C por quarenta e cinco segundos, hibridização a 50°C por um minuto e extensão final a 72°C por um minuto.

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (pH 8,0). Em cada gel um padrão de massa molecular de 100pb (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil) foi incluído. Após o término da corrida (60 volts/1 hora), o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5

µg/mL (INVITROGEN® – Life Technology do Brasil) e as bandas foram observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta (Pharmacia LKB –MacroVue) (**FIGURA 9**).

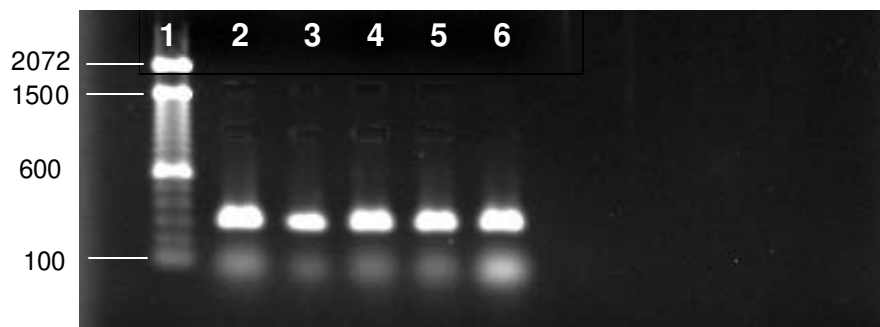


FIGURA 9 Confirmação da identificação de isolados de *P. intermedia*. Linha 1: padrão de peso molecular de 100 pares de base (pb); linha 2: *P. intermedia* HG110 (controle positivo) e linhas 3 a 6: isolados clínicos de *P. intermedia*

4.6. Extração de DNA

Após cultivo e identificação presuntiva dos isolados, foi realizada a extração de DNA dos isolados identificados como *P. intermedia/nigrescens* para diferenciação das duas espécies por meio de PCR e posterior genotipagem por AP-PCR. Também foram submetidas ao processo de extração, as amostras clínicas subgengivais iniciais que foram positivas para o cultivo de *P. intermedia* para a realização da análise heteroduplex.

Para a realização da extração de DNA genômico, uma quantidade de células bacterianas obtida da cultura pura com auxílio de uma alça de platina com capacidade de 1mL, foi armazenada em tubos *ependorf* contendo tampão Tris-EDTA (pH 8,0).

A extração de DNA dos isolados bacterianos seguiu o protocolo abaixo (DOYLE & DOYLE, 1990):

1. Preparo do material:

- Isolado clínico: o material foi agitado mecanicamente, centrifugado (10 minutos/10000 rpm) e em seguida, removeu-se o sobrenadante;
- Amostra clínica: agitação mecânica, remoção dos cones de papel absorvente, centrifugação (10 minutos/10000 rpm), seguida de remoção do sobrenadante.

2. Tampão de extração com proteinase K: uma alíquota de 700µL de tampão de extração com proteinase K foi adicionada à amostra, a mesma foi agitada e deixada em banho-maria por trinta minutos, sendo homogeneizada suavemente a cada dez minutos;

3. Clorofórmio/álcool isoamílico (CIA): adicionou-se 650µL de CIA, homogeneizou até formar uma emulsão. Depois de formada a emulsão, a amostra foi centrifugada à 12000rpm por sete minutos;

4. Tampão de extração sem proteinase K: a fase aquosa formada com a adição de CIA foi transferida para novo tubo *ependorf* de 1,5 mL e 200µL de tampão de extração sem proteinase K foi adicionado e homogeneizado;

5. Clorofórmio/álcool isoamílico (CIA): em seguida, adicionou-se 650µL de CIA, centrifugação à 12000rpm por sete minutos. Novamente a fase aquosa formada foi transferida para outro tubo *ependorf*. A

- adição de CIA foi repetida por mais uma ou duas vezes, até obtenção de uma fase aquosa transparente e límpida;
6. Precipitação do DNA: após obtenção de uma fase aquosa límpida, precipitou-se o DNA com adição de 500 μ L de álcool isopropílico à temperatura ambiente;
 7. Álcool etílico a 70%: após a centrifugação, removeu-se o álcool isopropílico e 50 μ L de álcool etílico a 70% foi adicionado para lavar a superfície do DNA precipitado, sem ressuspender. Novamente o precipitado foi centrifugado, seguido da remoção do etanol;
 8. Terminada a lavagem, o tubo *ependorf* foi deixado aberto ao lado de um bico de Busen até a secagem do precipitado;
 9. Para finalizar, o DNA foi ressuspendido em 50 μ L de tampão Tris-EDTA (pH 8,0) e adicionou-se com RNase.

A concentração de DNA foi calculada medindo a absorbância a 260nm e a qualidade do DNA isolado foi estimada pela razão A_{260}/A_{280} .

4.7. Genotipagem por AP-PCR

As alíquotas de DNA dos isolados positivamente identificados como *P. intermedia* foram submetidas à técnica de genotipagem por AP-PCR.

4.7.1. AP-PCR

A reação de AP-PCR foi processada utilizando-se 2 *primers* arbitrários: OPA-03 e OPA-13 (**TABELA 2**). Em torno de 300 ng de DNA foram adicionados a uma mistura de reagentes contendo 1X solução tampão (10X Reaction Buffer Taq

Polymerase, INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), 2,5 mM de MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP e dTTP a 20mM (INVITROGEN® – Life Technology do Brasil), 0,4 µM de *primer*, 2,5 U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN® – Life Technology do Brasil) (MÉNARD & MOUTON, 1995, GONÇALVES, ROBITAILLE & MOUTON, 1999).

TABELA 2- *Primers* arbitrários utilizados na reação de AP-PCR e suas seqüências

<i>Primer</i>	Seqüência
OPA 03	5'- AGTCAGCCAC-3'
OPA 13	5'- CAGCACCCAC-3'

Esta mistura reagente foi submetida a um aparelho termociclador convencional (GeneAmp PCR System 2400 – Perkin Elmer) de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min, hibridização do *primer* a 36°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, concluindo com extensão a 72°C for 5 min.

Os produtos resultantes da amplificação por AP-PCR foram analisados imediatamente por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (pH 8,0). Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular de 100 pb (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (90 volts/2 horas) o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 µL/mL (INVITROGEN®

– Life Technology do Brasil) e as bandas observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta. (**FIGURA 10**).

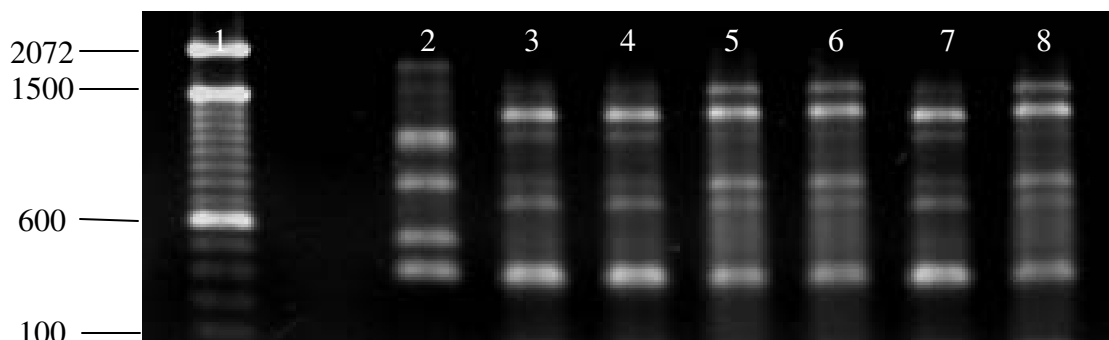


FIGURA 10- Perfis eletroforéticos de *P. intermedia* isolada de bolsa periodontal, obtidos pela técnica do AP-PCR utilizando o *primer* OPA-03. Linha 1: padrão de peso molecular de 100 pb; linha 2: *P. intermedia* HG 110 (controle positivo) e linhas 3 a 6: isolados clínicos de *P. intermedia*

4.7.2. Análise do padrão eletroforético

A documentação fotográfica foi obtida pelo sistema Image Master -VDS (Pharmacia Biotech®) e a captura das imagens foi realizada pelo programa computacional LISCAP. As imagens positivas e a demarcação das bandas eletroforéticas foram processadas através do programa Sigma Gel (Jandel Co.), para a obtenção da mobilidade relativa de cada banda (valores de Rf.) em função dos valores conhecidos dos padrões de tamanho/massa molecular (ROSA, 2000; ROSA, 2001; KLEIN, 2003).

4.7.3. Construção das matrizes e dendogramas de similaridade

As bandas eletroforéticas, representadas pelos valores de peso molecular foram convertidas em valores numéricos que receberam representações de um para a presença e zero para a ausência de bandas.

O conjunto de informações obtido gerou uma matriz de dados binários que foi submetida ao sistema NTSYS versão 1.7 (Applied Biostatistics), empregando o programa QUALITATIVE e o coeficiente de similaridade de DICE.

Através do mesmo pacote estatístico, as matrizes de similaridade foram submetidas ao programa SHAN CLUSTERING utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group method with mathematic average) (SNEATH & SOKAL, 1973), para construção de dendogramas. Os dendogramas forneceram os graus de similaridade existentes e o agrupamento dos possíveis genótipos presentes entre os isolados bacterianos (**ANEXO 2**).

5. Análise heteroduplex dos produtos da reação em cadeia da polimerase

A análise heteroduplex dos produtos da reação em cadeia da polimerase foi aplicada para investigar a presença de múltiplas cepas diretamente das amostras clínicas subgengivais, sem a necessidade de realizar previamente procedimentos de cultivo microbiano.

5.1. PCR

Apenas as amostras clínicas subgengivais iniciais que apresentaram resultado positivo para a cultura de *P. intermedia* foram submetidas à análise heteroduplex.

Primeiramente foi realizada a amplificação de uma seqüência específica de DNA por PCR. Os *primers* utilizados e as condições de amplificação foram os mesmos anteriormente descritos para identificação de *P. intermedia*. E o resultado da reação de amplificação foi observado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (pH 8,0).

5.2. Análise heteroduplex dos produtos de PCR das amostras clínicas

Em seguida, foi realizada a análise heteroduplex dos produtos amplificados das amostras clínicas.

Para análise heteroduplex, 20µL do produto amplificado foi colocado em tubo *ependorf* de 0,5mL e incubado em banho-maria a 95°C por 5 minutos para separar a dupla fita de DNA. Após o tempo de incubação, o produto foi deixado em temperatura ambiente (20°C) para resfriamento, por aproximadamente 30 minutos, para ocorrer a hibridização das fitas de DNA.

Posteriormente, o produto amplificado e resfriado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em tampão Tris-borato-EDTA, (pH 8,0). Em cada gel um padrão de massa molecular de 100pb (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil) foi incluído. Após o término da corrida (80 volts/140min) (**FIGURA 11**), o gel foi corado com nitrato de prata e a formação de heteroduplexes foi observada. A presença de uma ou duas bandas em adição a banda homoduplex indicou que duas cepas estavam presentes na amostra, enquanto a presença de três a seis bandas revelou a existência de três cepas na amostra (**FIGURA 12**) (LEYS *et al.*, 1999).

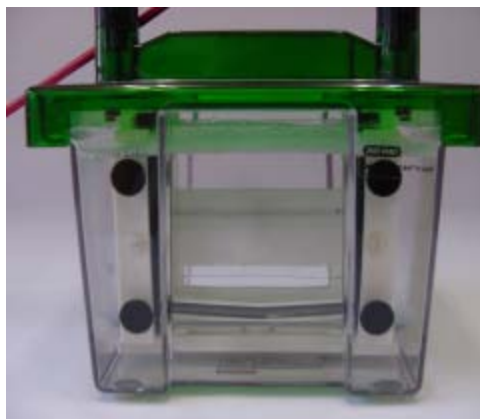


FIGURA 11- Aparato para eletroforese em gel de poliacrilamida (Bio Rad-Pharmacia Biotech[®])

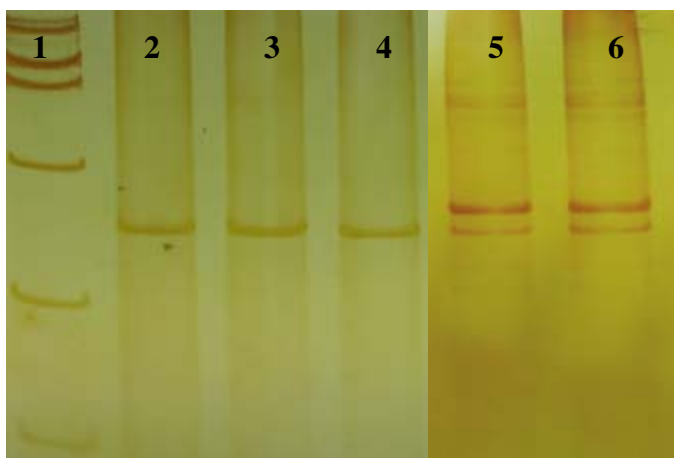


FIGURA 12- Perfil eletroforético das amostras clínicas submetidas a análise heteroduplex. Linha 1: padrão de peso molecular de 100pb; linhas 2-4: presença de apenas 1 cepa (homoduplex) e linhas 5-6: presença de duas cepas de *P. intermedia*

6. Delineamento estatístico

Para avaliar a prevalência de indivíduos positivos para a presença de pigmentados negros e prevalência de detecção e frequência das espécies identificadas foram aplicados o teste do Qui-Quadrado e teste exato de Fisher. No estudo das correlações entre a presença de espécies de pigmentados negros e

parâmetros clínicos periodontais a regressão logística simples foi utilizada. Na pesquisa da diversidade genética por AP-PCR e análise heteroduplex foram usados o teste do Qui-Quadrado, o teste exato de Fisher, coeficiente de correlação de Spearman e teste de regressão linear. Os testes foram aplicados pelo pacote estatístico *BioEstat* 2.0 e o nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1. Isolamento e Identificação

Na **TABELA 3** encontram-se todos os dados que caracterizam os voluntários positivos para presença de pigmentados negros quanto ao gênero, idade, profundidade de sondagem do sítio com destruição periodontal (sítio A), sangramento à sondagem e o número de isolados das espécies detectadas nos sítios A e B (sulco gengival). Enquanto a **TABELA 4** demonstra dados referentes aos indivíduos negativos para detecção de pigmentados negros.

Entre a população analisada, foram selecionados, de acordo com os critérios de inclusão, 36 indivíduos de ambos os gêneros, com idade variando entre 23 e 67 anos, com média e desvio padrão de $42,66 \pm 10,56$.

De acordo as informações registradas na ficha clínica de cada voluntário, a severidade da doença periodontal se enquadrava em grau moderado a severo de destruição periodontal.

O registro da profundidade de sondagem dos sítios de isolamento indicou formação de três grupos, um com até 3mm de profundidade que se refere aos sítios sem destruição periodontal, outro com profundidade maior 3mm e menor ou igual a 5mm e por último, o grupo com profundidade maior que 5mm, nestes dois últimos enquadram-se os sítios doentes.

Dos voluntários selecionados, foram obtidas setenta e duas amostras clínicas de placa subgengival, considerando duas amostras por indivíduo, uma proveniente do sítio A e outra, do sítio B, as quais foram submetidas ao processamento laboratorial para a realização do cultivo microbiológico.

TABELA 3- Dados dos indivíduos positivos para presença pigmentados negros, quanto ao gênero, idade (em anos), profundidade de sondagem (PS) do sítio A, sangramento à sondagem (SS; P= presente e A= ausente) e o número de isolados identificados nos sítios A e B

Voluntário	Gênero	Idade	PS	SS	Número de isolados									
					<i>P.i.</i>		<i>P.m.</i>		<i>P.l.</i>		<i>P.n.</i>		<i>P.g.</i>	
					A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	F	33	.5mm	P	6	0	0	0	0	0	0	0	2	0
2	M	66	.5mm	A	5	0	0	0	0	0	2	0	0	0
3	M	67	.5mm	P	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	F	34	.5mm	A	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
5	F	43	.5mm	P	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	M	52	.5mm	P	6	3	0	0	5	0	0	0	0	0
7	F	52	.5mm	A	0	0	6	0	11	0	0	0	0	0
8	F	47	.5mm	P	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
9	F	25	.5mm	P	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	M	42	.5mm	A	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0
11	F	37	.5mm	P	6	4	2	1	0	0	0	0	0	0
12	F	44	.5mm	A	7	0	2	0	0	0	0	0	0	0
13	F	41	.5mm	P	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	M	31	.5mm	P	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	M	33	.5mm	P	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
16	M	48	.5mm	P	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
17	M	41	.5mm	P	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 4- Dados individualizados dos voluntários negativos para a detecção de pigmentados negros, quanto ao gênero (F= feminino; M= masculino), idade (em anos), profundidade de sondagem do sítio A e sangramento à sondagem (A= ausente; P= presente)

Voluntário	Gênero	Idade	Profundidade de sondagem	Sangramento à sondagem
18	F	23	>5mm	P
19	M	45	>5mm	A
20	F	35	≤5mm	A
21	M	41	>5mm	P
22	F	35	≤5mm	P
23	M	49	≤5mm	A
24	F	43	≤5mm	A
25	F	51	≤5mm	A
26	M	25	≤5mm	A
27	F	46	≤5mm	A
28	F	54	≤5mm	A
29	F	48	>5mm	P
30	F	38	≤5mm	A
31	M	48	>5mm	P
32	F	61	>5mm	P
33	F	44	≤5mm	A
34	F	38	>5mm	P
35	F	27	>5mm	P
36	F	49	>5mm	P

Quanto à avaliação microbiológica, a **TABELA 5** e **FIGURA 13** indicam a prevalência de indivíduos positivos para a detecção de pigmentados negros nos sítios A e B. Ao comparar os sítios de isolamento com relação à presença desses microrganismos, utilizando o teste do Qui-Quadrado, diferença estatisticamente significativa foi observada ($p = 0,0115$).

TABELA 5- Prevalência (%) de indivíduos positivos para a detecção de pigmentados negros nos sítios A, B e A/B

	Sítio A	Sítio B	Sítios A/B
Pigmentados negros	17 (47,2%)	6 (16,6)	6 (16,6)

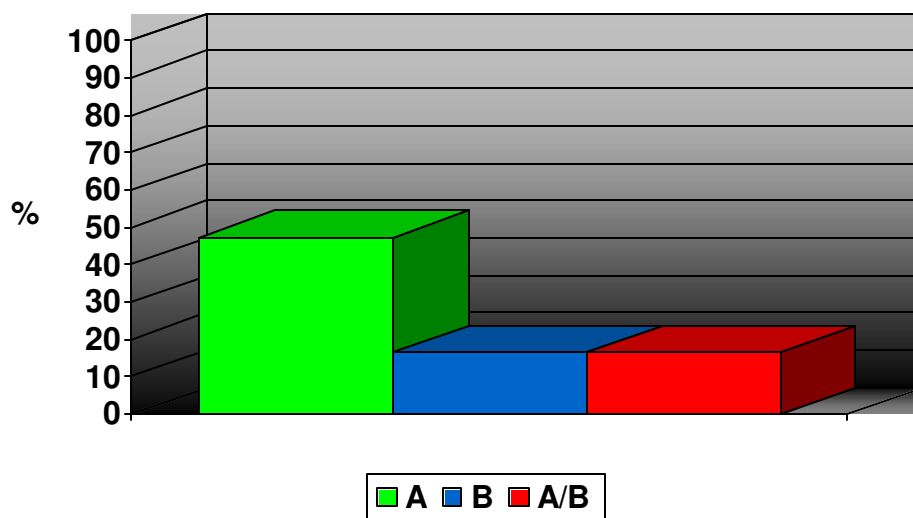


FIGURA 13- Prevalência de indivíduos positivos para a presença de pigmentados negros nos sítios A, B e A/B

Foram obtidos 128 isolados de pigmentados negros, dos quais as espécies identificadas foram *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* representando prevalência de 63,3%, 14%, 12,5%, 6,2% e 3,9%, respectivamente (**TABELA 6** e **FIGURA 14**). O teste de tendência do Qui-Quadrado indicou diferença estatisticamente significativa entre os sítios A e B ($p = 0,0046$), tendo este último como controle.

A prevalência de indivíduos positivos para a presença de *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* foi de 33,3%, 13,9%, 5,5%, 8,3% e 5,5%, respectivamente, considerando ambos os sítios de isolamento. Sem diferença estatisticamente significativa entre os sítios (teste do Qui-Quadrado e teste exato de Fisher; $p > 0,05$) (**TABELA 7** e **FIGURA 15**).

Na **TABELA 8** e **FIGURA 16** observa-se a freqüência de detecção das espécies identificadas em ambos os sítios. Ao comparar a freqüência das bactérias entre os sítios, aplicando o teste de tendência do Qui-quadrado, não se observou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O mesmo resultado foi obtido quando os sítios foram comparados considerando a *P. intermedia* isoladamente e as demais espécies formando um único grupo (teste exato de Fisher; $p > 0,05$).

TABELA 6- Número de isolados de espécies identificadas nos sítios A e B

	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella loescheii</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Sítio A	63	17	16	8	5
Sítio B	18	1	0	0	0
Total de isolados	81 (63,3%)	18 (14%)	16 (12,5%)	8 (6,2%)	5 (3,9%)

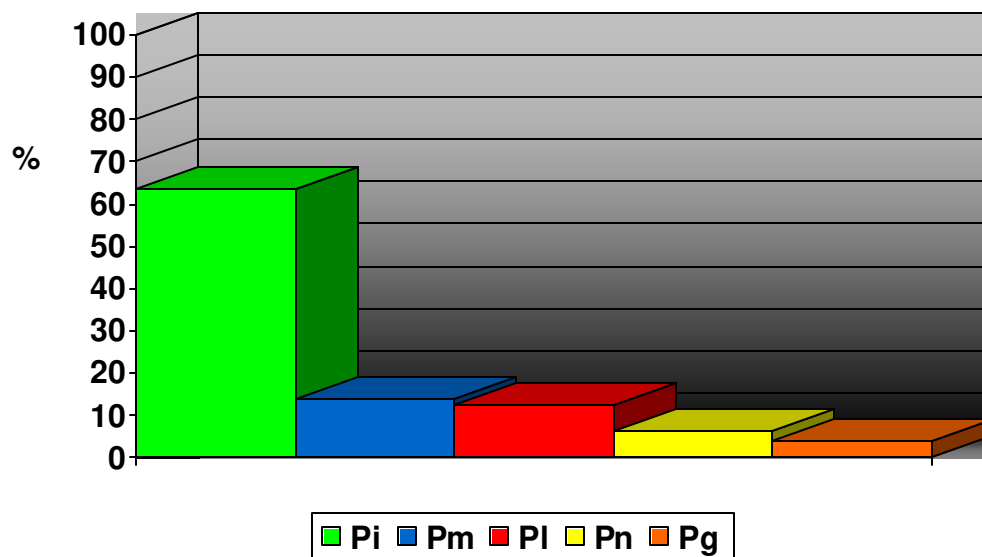


FIGURA 14- Prevalência de isolados das espécies *P. intermedia* (*P.i.*), *P. melaninogenica* (*P.m.*), *P. loescheii* (*P.l.*), *P. nigrescens* (*P.n.*) e *P. gingivalis* (*Pg*

TABELA 7- Prevalência de indivíduos positivos para a presença das espécies identificadas considerando o sítio A, B e A/B

	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella loescheii</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Sítio A	12	5	2	3	2
Sítio B	5	1	0	0	0
Sítios A/B	5	1	0	0	0
Total	12 (33,3%)	5 (13,9%)	2 (5,5%)	3 (8,3%)	2 (5,5%)

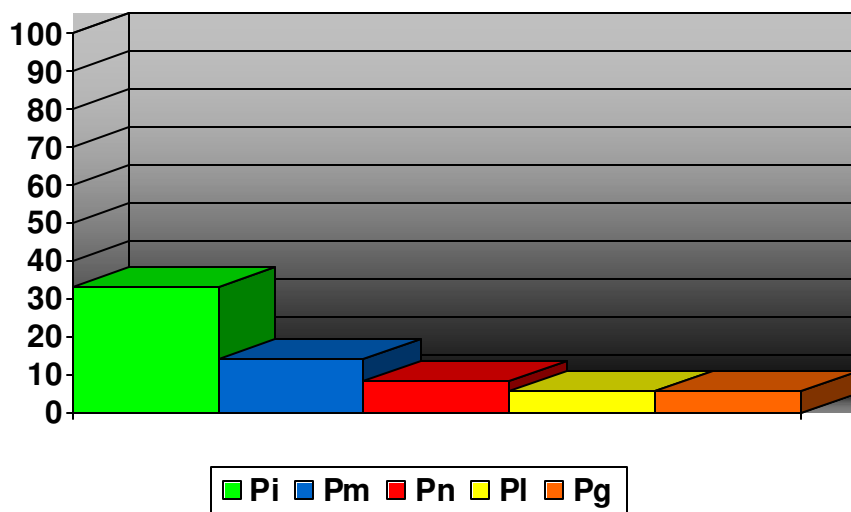


FIGURA 15- Prevalência de indivíduos com doença periodontal positivos para a presença de *P. intermedia* (*P.i.*), *P. melaninogenica* (*P.m.*), *P. nigrescens* (*P.n.*), *P. loescheii* (*P.l.*) e *P. gingivalis* (*Pg*) nos sítios A e B

TABELA 8- Frequência de detecção das espécies identificadas nos sítios A e B

	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella loescheii</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Sítio A	12 (70,6%)	5 (29,4%)	2 (11,8%)	3 (17,6%)	2 (11,8)
Sítio B	5 (29,4%)	1 (5,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

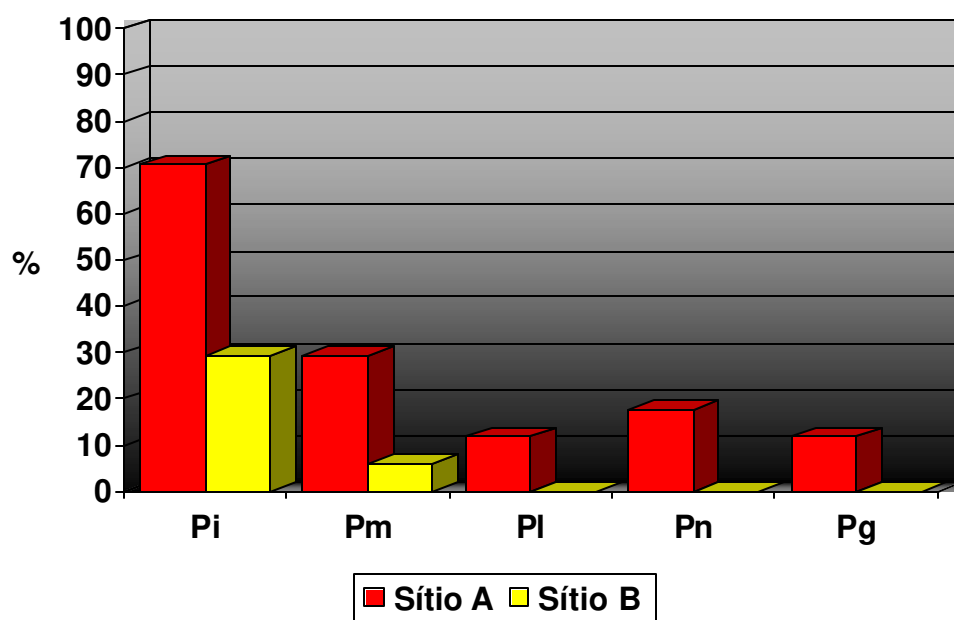


FIGURA 16- Frequência de detecção das espécies *P. intermedia* (*P.i.*), *P. melaninogenica* (*P.m.*), *P. loescheii* (*P.l.*), *P. nigrescens* (*P.n.*) e *P. gingivalis* (*Pg*) nos sítios A e B

O estudo das correlações, utilizando a regressão logística simples, revelou as seguintes associações significativas: (1) presença pigmentados negros x sangramento à sondagem ($p= 0,0219$) e (2) *Prevotella intermedia* x profundidade de sondagem ($p= 0,0396$).

6.2. Análise genética da espécie *Prevotella intermedia* por AP-PCR

Foram submetidos a genotipagem por AP-PCR 80 isolados clínicos de *P. intermedia*.

A amplificação do DNA genômico desta espécie pelo *primer* OPA-03 gerou produtos de AP-PCR variando entre 1572 e 190 pb, enquanto o *primer* OPA-13 gerou produtos de 1462 a 244 pb.

A análise dos perfis eletroforéticos, gerados pela técnica de AP-PCR através da utilização de dois *primers* arbitrários (OPA-03 e OPA-13), permitiu a construção de dendogramas representativos dos diferentes genótipos de *P. intermedia* detectados em voluntários portadores de doença periodontal, revelando a ocorrência de 29 diferentes genótipos estabelecidos nos sítios com e sem doença, sendo que a maioria dos indivíduos mostrou-se colonizada por um a dois genótipos distintos (**FIGURAS 17 e 18**) (**ANEXO 2**).

Na análise intra-indivíduo não houve detecção de genótipos idênticos entre os sítios com e sem destruição periodontal (**FIGURA 19**) e, a investigação entre indivíduos, revelou que os voluntários não compartilhavam o mesmo tipo clonal.

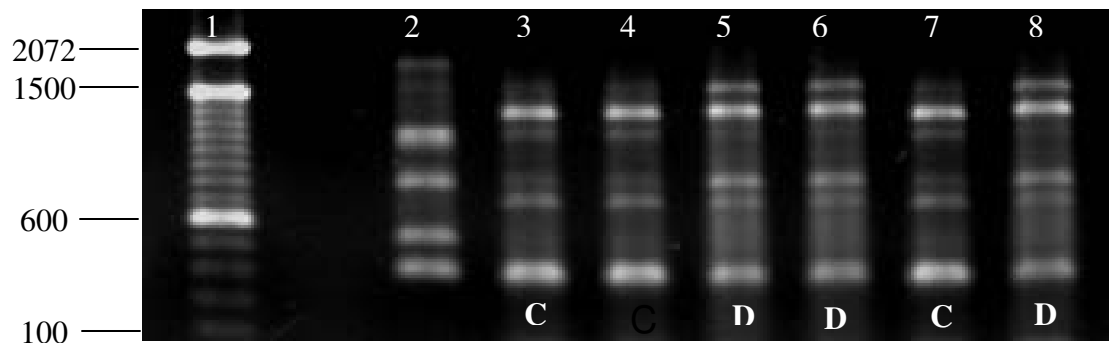


FIGURA 17- Voluntário 1 colonizado por dois genótipos distintos detectados na bolsa periodontal. Linha 1: padrão de peso molecular de 100pb; linha 2: controle positivo (HG110); apresentam o mesmo perfil eletroforético as linhas 3, 4 e 7 (genótipo C) e as linhas 5, 6 e 8 (genótipo D)

*As letras maiúsculas representam os diferentes tipos de genótipos detectados

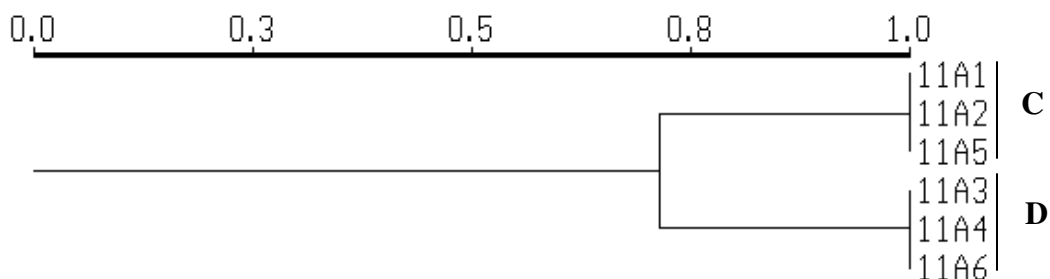


FIGURA 18- Dendrograma representativo dos diferentes genótipos de *P. intermedia* detectados na bolsa periodontal do voluntário 1

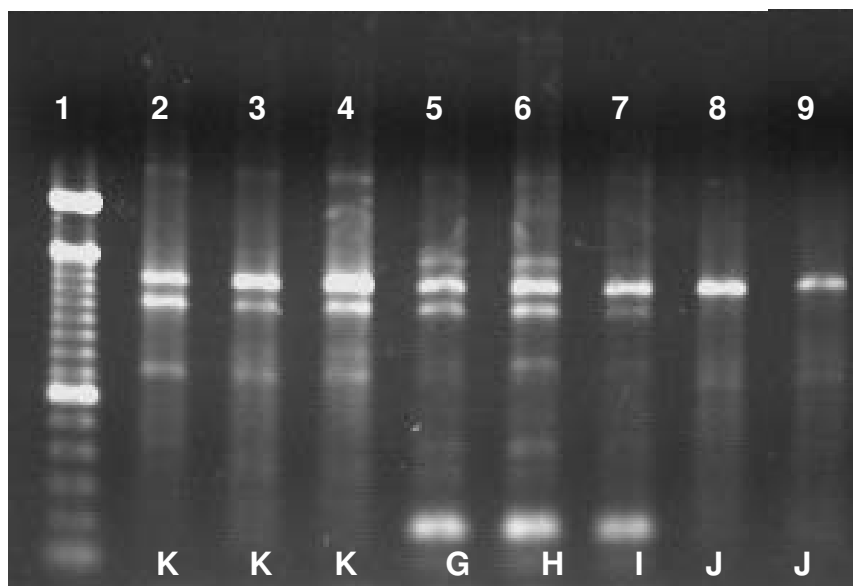


FIGURA 19- Diferentes genótipos detectados entre os sítios com e sem destruição periodontal de um mesmo indivíduo. Linha 1: padrão de peso molecular de 100pb; linhas 2-4: sítio sem destruição periodontal e linhas 4-9: sítio com bolsa periodontal

Na **TABELA 9** encontra-se o número de isolados testados, o número de genótipos obtidos e o número de voluntários que abrigou de um a quatro diferentes tipos de genótipos.

A maior ocorrência de genótipos diferenciados foi observada com o aumento da profundidade de sondagem como pode ser observado na **TABELA 9**. Essa tendência crescente do número de genótipos foi confirmada pelo teste do Qui-Quadrado revelando diferença estatisticamente significativa ($p=0,003$).

A análise do número de genótipos e sua relação com a quantidade de isolados de *P. intermedia* foi analisada por meio da aplicação do coeficiente de correlação de Spearman e pelo teste de regressão linear. Os resultados obtidos não mostraram

associação estatisticamente significativa entre o número de genótipos detectados e o número de isolados ($p > 0,05$).

TABELA 9- Número de isolados tipados, número de genótipos detectados e número de voluntários (vol.) colonizados com 1, 2, 3 e 4 genótipos distintos de acordo com a profundidade de sondagem

Profundidade de sondagem	Nº isolados	Nº genótipos	Nº vol. 1 genótipo	Nº vol. 2 genótipos	Nº vol. 3 genótipos	Nº vol. 4 genótipos
Até 3mm	18	6	4	1	0	0
≤ 5mm	30	8	4	2	0	0
> 5mm	32	15	0	4	1	1
Total	80	29	8	7	1	1

A **FIGURA 20** demonstra o número de isolados e de genótipos detectados em sítios com diferentes profundidades de sondagem. A comparação entre as proporções de número de isolados e número de genótipos no sítio A, com profundidade de sondagem $\leq 5\text{mm}$ e $> 5\text{ mm}$, e no sítio B através do teste do Qui-Quadrado, não revelou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

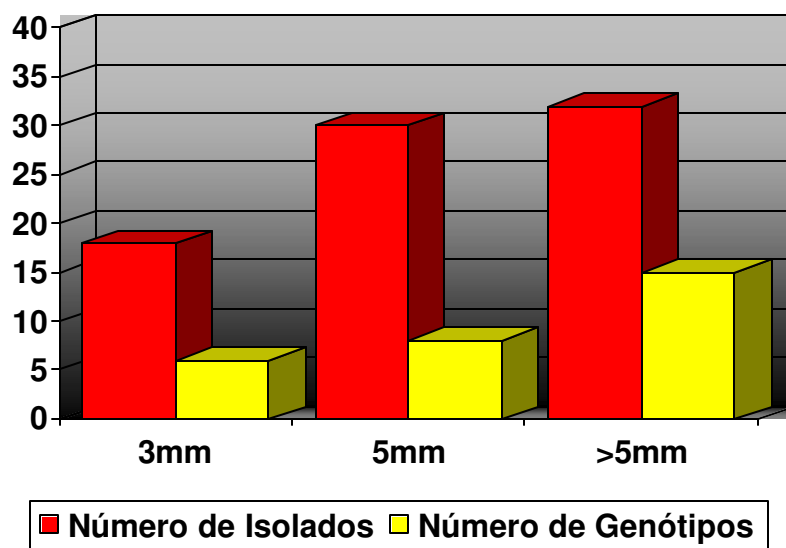


FIGURA 20- Número de isolados e de genótipos em sítios com diferentes profundidades de sondagem

A construção de dendogramas revelou, intra-indivíduo, o grau de similaridade entre os genótipos de *P. intermedia*, indicado na **TABELA 10**. Foram considerados mesmos genótipos as cepas com grau de similaridade de 95-100%

TABELA 10- Similaridade entre genótipos detectados pela técnica do AP-PCR, nos sítios A e B

Voluntário	Nº genótipos		
	Sítio A	Sítio B	Sítio A/B
1	2	—	< 80%
2	2	—	< 70%
3	4	1	<70%
4	3	2	90% - 70%
5	2	1	50% - 80%
6	1	—	100%
7	1	1	60%-100%
8	1	1	35%-100%
9	2	—	±60%
10	2	—	±50%
11	1	—	100%
12	2	—	±50%

6.2. Análise heteroduplex dos produtos amplificados por PCR

Na **TABELA 11** estão indicados os resultados da identificação de *P. intermedia* por PCR diretamente das amostras clínicas, utilizando *primer* espécie específico.

TABELA 11- Identificação de *P. intermedia* através de PCR das amostras clínicas comparada ao resultado do cultivo microbiológico

Voluntário	Identificação <i>Prevotella intermedia</i>			
	PCR		CULTURA	
	Sítio A	Sítio B	Sítio A	Sítio B
1	+	—	+	—
2	+	+	+	—
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	—
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	+	+	+	—
11	+	+	+	—
12	+	+	+	—

Ao comparar a identificação de *P. intermedia* no sítio B pelos métodos da PCR e cultura microbiana, diferença estatisticamente significativa foi observada pelo teste exato de Fisher ($p = 0,0447$).

Em seguida, a análise heteroduplex dos produtos amplificados revelou a presença de uma a três diferentes clones existentes nas amostras clínicas pesquisadas. Na **TABELA 12** e **FIGURA 21** observa-se o número de genótipos detectados por AP-PCR e o número de cepas detectadas diretamente das amostras clínicas subgengivais pela análise heteroduplex.

Ao comparar as duas técnicas utilizadas, AP-PCR e análise heteroduplex, na detecção de genótipos nos sítios A e B, não foi observada diferença estatisticamente significativa através do teste exato de Fisher ($p > 0,05$).

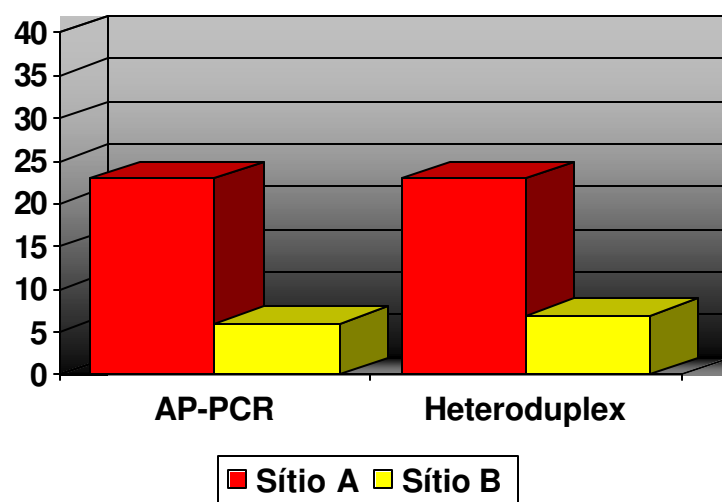


FIGURA 21- Número de genótipos detectados nos sítios A e B, pela técnica de AP-PCR e análise heteroduplex

TABELA 12- Número de genótipos de *P. intermedia* detectados pela análise heteroduplex do produto de PCR e pela técnica de AP-PCR nos sítios A e B

Voluntário	Nº genótipos			
	Análise heteroduplex		AP-PCR	
	A	B	A	B
1	2	—	2	—
2	2	—	2	—
3	3	1	4	1
4	3	2	3	2
5	2	2	2	1
6	1	—	1	—
7	1	1	1	1
8	1	1	1	1
9	2	—	2	—
10	1	—	1	—
11	2	—	2	—
12	3	—	2	—
Total	23	7	23	6

6. DISCUSSÃO

As doenças periodontais compreendem um grupo de infecções que compromete os tecidos de suporte dos dentes. O grau de severidade varia entre a ocorrência de inflamação leve e reversível da gengiva à destruição crônica dos tecidos periodontais com eventual perda do elemento dentário. Do ponto de vista microbiológico, diversos aspectos na etiopatogenia dessa doença são de interesse. A etiologia bacteriana é complexa, com uma variedade de microrganismos podendo ser responsáveis pelo início e progressão da doença. Muitos desses microrganismos, senão todos, podem também estar presentes em indivíduos com periodonto saudável estabelecendo uma harmonia comensal com o hospedeiro. Então, episódios de doença podem representar mudança no equilíbrio ecológico entre a bactéria e fatores do hospedeiro, como resultado de, por exemplo, alteração no número relativo ou absoluto de certos microrganismos, mudanças no potencial patogênico ou modulação de fatores específicos do hospedeiro (LAMONT & JENKINSON, 1998).

Apesar do grande número de espécies bacterianas identificadas no ambiente do sulco gengival e/ou bolsa periodontal, evidências revelam que o processo de destruição do periodonto envolve o estabelecimento, crescimento e inter-relação de determinados grupos de espécies bacterianas. Nesse quadro, aparentemente alguns bastonetes anaeróbios Gram-negativos produtores de pigmento negro possuem um papel importante na etiopatogenia da doença periodontal. Entre as espécies conhecidas que pertencem ao grupo, a *P.*

intermedia e *P. gingivalis* têm sido fortemente relacionadas com a etiologia e progressão do processo de doença que envolve o periodonto (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992).

No presente estudo, para análise microbiológica, amostras subgengivais de placa dental foram obtidas em dois diferentes sítios em um mesmo indivíduo, o **sítio A** representando o *pool* de sítios com bolsa periodontal e o **sítio B** representando sítios sem bolsa periodontal e sem sangramento. Métodos de cultivo de anaeróbios produtores de pigmento negro foram utilizados, para analisar a diversidade genética da espécie *P. intermedia* pela técnica de AP-PCR. Nesta técnica a cultura prévia se faz necessária para obtenção dos isolados a serem tipados, mas alternativamente foram feitas a detecção diretamente da amostra por PCR e genotipagem pela análise heteroduplex, para obter dados adicionais para compreensão mais ampla da estrutura clonal dessa espécie, assim como sua associação com a doença.

O método de cultivo de microrganismos é ainda considerado um método de referência ("golden standard"), em comparação a outras técnicas utilizadas, para determinação da presença de microrganismos. Dentre as vantagens, pode-se citar a possibilidade de quantificar as espécies isoladas, a possibilidade de se obter cepas em cultura pura para realização de pesquisas posteriores como a genotipagem, estudos sobre fatores de virulência e, ainda, é o único meio para obtenção do antibiograma. Por outro lado, consiste de etapas laboratoriais exaustivas e onerosas e também, produz menores valores de detecção quando

comparada com métodos de detecção baseada nos princípios da biologia molecular, onde teoricamente números inusitadamente baixos de microrganismos podem ser detectados (ASHIMOTO *et al.*, 1996). Fato observado no presente estudo ao comparar os resultados da identificação de *P. intermedia* por PCR e por cultura, onde o número de sítios saudáveis PCR-positivos para presença dessa espécie foi consideravelmente maior.

Portanto, a não detecção de determinadas espécies não significa necessariamente sua ausência, mas sim que o número de microrganismos presentes pode estar abaixo da sensibilidade de detecção da técnica utilizada. O que explica a baixa prevalência de detecção de pigmentados negros em sítios sem destruição periodontal. Por outro lado, parece ser questionável o significado clínico da detecção de patógenos que representam uma proporção diminuta da microbiota bucal, em termos de consistência de colonização e também se em níveis tão baixos são capazes de oferecer virulência suficiente para causar a destruição dos tecidos de suporte do dente (CHEN *et al.*, 1997).

A prevalência de indivíduos positivos para a presença de pigmentados negros nos sítos A e B foi de 47,2% (17/36) e 16,6% (6/36), respectivamente, com diferença estatisticamente significativa. Dados estes comparáveis aos obtidos por DAHLÉN *et al.* (1992); McNABB *et al.* (1992), TEANPAISAN *et al.*, (1995); MAEDA *et al.* (1998). Vale ressaltar, que os sítios sem bolsa periodontal positivos para a presença de pigmentados negros ocorreram sempre em indivíduos com sítio com doença também positivo para essas espécies bacterianas. Estes resultados

indicam a estreita relação desse grupo de microrganismo com o processo de doença periodontal.

Os resultados de isolamento e identificação de pigmentados negros mostraram maior prevalência e frequência de detecção de espécies do gênero *Prevotella*, talvez por maior facilidade de cultivo, pois as mesmas parecem tolerar níveis mínimos de oxigênio, fato que não ocorre com as espécies do gênero *Porphyromonas*, consideradas espécies mais fastidiosas (MÉNARD & MOUTON, 1995), portanto podem ser subestimadas por técnicas de cultivo como as aplicadas em nosso estudo.

A prevalência de indivíduos positivos para a presença das espécies *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis* foi de 33,3%, 13,9%, 5,5%, 8,3% e 5,5% respectivamente, com diferença estatisticamente significativa entre os sítios de isolamento.

A prevalência depende do número de sítios amostrados por paciente, do método de identificação bacteriana usado e dos limites de detecção da técnica aplicada. A prevalência de *P. gingivalis* neste estudo foi menor do que a encontrada em estudos anteriores (DAHLÉN *et al.*, 1992; McNABB *et al.*, 1992; TEANPAISAN *et al.*, 1995; van WINKELHOFF, 2002), mas foi similar ao nível de detecção encontrado por TEANPAISAN, DOUGLAS & NITTAYANANTA (2001).

Em contraste a *P. gingivalis*, elevada prevalência de *P. intermedia* foi também encontrada em outras pesquisas utilizando técnicas de cultivo microbiano (van STEENBERGEN *et al.*, 1991; DAHLÉN *et al.*, 1992; McNABB *et al.*, 1992;

TEANPAISAN *et al.*, 1995; MAEDA *et al.*, 1998; MOMBELLI *et al.*, 2000). E diferente do resultado encontrado por van WINKELHOFF *et al.* (2002), o qual revelou maior prevalência de isolados de *P. gingivalis*.

Das espécies do grupo dos anaeróbios produtores de pigmento negro, a *P. gingivalis* é considerada uma das mais virulentas e entre as diversas centenas de espécies bacterianas da cavidade bucal humana, talvez seja a mais intensamente estudada. A presença dessa espécie é consistentemente associada à severa inflamação periodontal, aumento na profundidade de sondagem, pobre higiene bucal e perda de inserção periodontal (SOCRANSKY *et al.*). Embora a primeira vista a *P. intermedia* pareça ser menos virulenta quando comparada a *P. gingivalis*, esta espécie possui vários fatores de virulência, como componentes da parede celular e atividade enzimática capazes de degradar, por exemplo, imunoglobulinas, fibronectina, algumas proteínas do plasma, elastina e cistatina C (DORN, LEUNG & PROGULSKE-FOX *et al.*, 1998).

A baixa prevalência de *P. nigrescens* observada neste estudo suportam os achados de van STEENBERGEN *et al.* (1991) e MAEDA *et al.* (1998) que afirmam que a maioria das espécies *Prevotella* em indivíduos saudáveis é *P. nigrescens*, enquanto sítios ativos e saudáveis em pacientes com infecção periodontal são principalmente colonizados por *P. intermedia*. Corroborando os achados de MÄTTÖ *et al.* (1996a) que consideram que colonização de *P. intermedia* parece ser mais estável em sítios com destruição periodontal quando comparados com sítios saudáveis. Em contrapartida, TEANPAISAN *et al.* (1995) relataram que

ambas as espécies foram encontradas freqüentemente em sítios com e sem doença periodontal. Portanto, parece possível especular que a prevalência de *P. nigrescens* observada neste estudo poderia ser mais elevada se voluntários sem doença periodontal fizessem parte da amostra.

Poucos são os relatos sobre o papel das espécies *P. melaninogenica* e *P. loescheii* na etiologia das doenças periodontais. Segundo TEANPAISAN *et al.* (1995) e MÄTTÖ *et al.* (1996a) essas espécies parecem pertencer a microbiota indígena da cavidade bucal sem relação causal com as infecções periodontais. DAHLÉN *et al.* (1992) isolaram a *P. melaninogenica* em 14% das amostras subgengivais, semelhante ao obtido nesta pesquisa.

A comparação dos resultados deste trabalho com os de diversos estudos que determinam a prevalência de patógenos periodontais subgengivais por cultura, imunofluorescência, ELISA, sonda de DNA e PCR, apresenta certa limitação devido às peculiaridades próprias de cada metodologia e também variações regionais, diferenças étnicas, nível-sócio econômico e padrão de higiene bucal devem ser considerados, pois tornam difícil a análise comparativa de diferentes populações.

Neste estudo também se avaliou a existência de correlações entre os parâmetros clínicos periodontais e a presença de bacteroides negros, sendo observadas correlações significativas do sangramento à sondagem com a presença de bacteroides negros e da profundidade de sondagem com a detecção de *P. intermedia*.

Vários outros trabalhos encontraram correlações desse tipo, SOCRANSKY *et al.* (1998) relataram forte relação do complexo microbiano formado por *P. gingivalis*, *A.a.* e *Tannerella forsythensis* (*B. forsythus*) com alguns parâmetros clínicos periodontais, particularmente a profundidade de bolsa e sangramento à sondagem e MOMBELLI *et al.* (2000) demonstraram relação altamente significativa entre a tendência de sangramento durante a colheita da amostra subgingival e o número de sítios positivos para *P. intermedia/nigrescens*. Todavia, outros autores não demonstraram essas correlações (RIVIERE & DeROUEN, 1998; TIMMERMAN *et al.*, 1998)

A variação no relato da existência dessas correlações tem sido explicada, em parte, pela dificuldade de mensurar a verdadeira progressão da doença periodontal, possibilidade da diversidade clonal, ou ainda, porque a microbiota estaria mais estreitamente relacionada ao ambiente ecológico do que às mudanças no nível de inserção clinicamente detectável (DAHLÉN *et al.*, 1992).

Após o isolamento e identificação dos anaeróbios produtores de pigmento negro, iniciou-se a investigação da diversidade genética entre os isolados da espécie mais prevalente no presente estudo, a *P. intermedia*. Apesar de evidências de sua participação no processo das infecções periodontais, existem poucos dados na literatura sobre a diversidade clonal dessa espécie.

A técnica de AP-PCR mostrou-se um recurso relativamente fácil, reproduzível e com poder discriminatório aplicável para pesquisar a diversidade clonal de isolados, obtendo-se 100% de aproveitamento na análise das amostras.

Isto está de acordo com trabalhos publicados anteriormente (CHEN & SLOTS, 1994; MÉNARD & MOUTON, 1995; MÄTTÖ *et al.*, 1996b; GONÇALVES, ROBITAILLE & MOUTON, 1999; TEANPAISAN, DOUGLAS & NITTAYAMANTA, 2001; KLEIN, 2003). A combinação de resultados da genotipagem por AP-PCR utilizando dois *primers* arbitrários, OPA-03 e OPA-13, revelou melhor habilidade discriminatória do primer OPA-03. Corroborando o resultado de MÄTTÖ *et al.* (1996b) que encontrou heterogeneidade adicional ao utilizar o *primer* OPA-03.

A análise da diversidade genética dos isolados de *P. intermedia*, independente do sítio de isolamento, revelou que a maioria dos indivíduos abrigou de um a dois diferentes clones, com exceção de dois voluntários. Concordantemente, van STEENBERGEN *et al.* (1991), MÄTTÖ *et al.* (1996a), MÄTTÖ *et al.* (1996b), TEANPAISAN *et al.* (1996), TEANPAISAN, DOUGLAS & NITTAYAMANTA (2001), utilizando a técnica de AP-PCR ou outros métodos de genotipagem, concluíram que indivíduos são colonizados por poucos tipos clonais de *P. intermedia*, independente do sítio de colonização e do padrão clínico periodontal.

A aumento da profundidade de sondagem foi acompanhado pelo aumento do número de genótipos, isto talvez seja reflexo das mudanças nas condições ambientais, pois segundo TEANPAISAN *et al.* (1996) fatores relacionados com o ambiente da bolsa proveriam esse periodontopatógenos com a oportunidade em aumentar em proporção e expressar seus fatores de virulência. Na mesma linha de raciocínio, SOCRANSKY & HAFFAJEE (1992) sugeriram que a produção de

fatores de virulência por patógenos periodontais poderia ser influenciada por fatores ambientais, como demonstram os resultados de MAEDA *et al.* (1998) que ao avaliarem a atividade enzimática entre os isolados de *P. intermedia* observaram que todos apresentavam reações positivas para produção de fosfatase alcalina, esterase, esterase-lipase, quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -glucosidase e α -fucosidase, mas os isolados obtidos em sítios periodontais ativos produziam nível elevado dessas enzimas com diferença significativa quando comparados àqueles de indivíduos saudáveis e de sítios inativos de pacientes com doença periodontal. Apesar de no presente estudo, não ter sido comparada a expressão de fatores de virulência entre os clones de sítios com e sem destruição periodontal, os dados obtidos sobre colonização seletiva de clones nos diferentes sítios sugerem que o ambiente de colonização pode oferecer melhores condições para determinados clones exercerem sua virulência. Esta é uma linha de pesquisa intrigante e que deve ser mais amplamente pesquisada.

Estudos sobre a clonalidade de outras espécies de bactérias envolvidas com a etiopatogenia da doença periodontal, também revelam a detecção de poucos tipos clonais por pacientes/sítio. Pesquisando a diversidade clonal de *P. gingivalis*, TEANPAISAN *et al.* (1996) encontraram de um a dois diferentes genótipos dessa espécie colonizando indivíduos com e sem destruição periodontal. Do mesmo modo, SAARELA *et al.* (1993) demonstraram que o *A.a.* parece colonizar a cavidade bucal com poucos padrões de ribotipos.

O padrão de distribuição clonal de outras espécies de pigmentados negros, como a *P. nigrescens* e *P. melaninogenica*, parece diferir das espécies *P. gingivalis* e *P. intermedia*. KÖNÖNEN *et al.* (1994) identificaram, intra e interindividualmente, extensa heterogeneidade na espécie *P. melaninogenica* ao pesquisarem a transmissibilidade entre mães e filhos. TEANPAISAN *et al.* (1996) detectaram tipos clonais múltiplos de *P. nigrescens* em 43% dos indivíduos. Em contrapartida, GONÇALVES, ROBITAILLE & MOUTON (1999) encontram apenas um tipo clonal de *P. nigrescens* que colonizava sítios periodontais e endodônticos na mesma cavidade bucal.

Para que uma espécie bacteriana seja considerada verdadeiramente patogênica, apenas um número relativamente pequeno de clones constituintes dessa espécie deve estar associado com doença (BAKER *et al.*, 2000). Por exemplo, enquanto mais de 104 tipos clonais de *Haemophilus influenzae* sorotipo b já foram identificados, apenas seis clones foram relacionados com 81% dos casos de doença. As razões para a clonalidade de uma espécie patogênicas não são claras, mas pode ser que apenas um tipo clonal possua todos os determinantes de virulência necessários, talvez devido a eventos de recombinação entre diferentes linhagens de uma espécie ou pela aquisição de um gene de virulência (PEARCE *et al.*, 2000).

Por outro lado, pode ser que todos os clones de uma espécie sejam igualmente patogênicos. Veja que TEANPAISAN *et al.* (1996) encontraram ribotipos e tipos REA idênticos colonizando sítios com e sem destruição

periodontal em um mesmo indivíduo. Da mesma forma, PEARCE *et al.* (2001) não detectaram ribotipos típicos de *P. intermedia* associados com uma condição de doença em particular, tanto em sítios bucais quanto em extrabucais.

Talvez deva ser considerada a natureza da infecção. As doenças periodontais são exemplos de infecções polimicrobianas, portanto pode ser que a estrutura clonal das espécies envolvidas nesse tipo de infecção, seja diferente da encontrada em infecções monomicrobianas, onde pode prevalecer um tipo clonal.

Ao contrário de TEANPAISAN *et al.* (1996) e PEARCE *et al.* (2001), no presente estudo, a análise intra-indivíduo (cinco voluntários) revelou a ausência de genótipos idênticos entre os sítios com e sem doença. Este achado pode indicar a existência de clones relacionados com diferentes padrões clínicos periodontais ou alternativamente, as condições ambientais em bolsas periodontais ofereçam um ambiente de colonização mais favorável para a instalação de determinados tipos clonais.

É possível que clones detectados nos sítios com destruição periodontal sejam cepas mais virulentas que apresentam recursos para dominar aquele nicho ecológico e inibir a sobrevivência ou colonização de cepas menos virulentas (LEYS *et al.*, 1999), uma vez que no ambiente da bolsa periodontal as condições ambientais são adversas, de modo a conduzir a expressão de fatores de virulência de determinadas cepas constituintes de uma espécie (LAMONT & JENKINSON, 1998).

Diferenças na capacidade de agredir o hospedeiro têm sido demonstradas entre cepas de periodontopatógenos. DORN, LEUNG & PROGULSKE-FOX (1998) detectaram heterogeneidade na capacidade de invasão de células epiteliais humanas entre os isolados clínicos de *P. intermedia*, dos quais apenas um isolado conseguiu invadir, enquanto outros isolados e a cepa 25611 não foram encontrados no interior de células epiteliais. Do mesmo modo, BAKER *et al.* (2000) demonstraram que diferentes cepas de *P. gingivalis* possuem diferenças na capacidade de induzir perda óssea alveolar em ratos germ-free expostos a esse microrganismo.

No entanto, certas observações não permitem conclusões definitivas quanto a identificação de clones específicos associados com doença, pois na análise entre indivíduos ampla heterogeneidade genética da espécie de *P. intermedia* foi observada, uma vez que os indivíduos participantes da pesquisa não compartilharam o mesmo perfil eletroforético. Corroborando os resultados de van STEENBERGEN *et al.* (1991), MÄTTÖ *et al.* (1996a), MÄTTÖ *et al.* (1996b), TEANPAISAN *et al.* (1996), GONÇALVES, ROBITAILLE & MOUTON (1999) e TEANPAISAN, DOUGLAS & NITTAYANANTA (2001) que afirmam a rara ocorrência de infecção cruzada entre indivíduos não pertencentes de uma mesma família.

Para MÉNARD & MOUTON (1995) a heterogeneidade entre isolados de uma espécie patogênica reflete os seguintes aspectos: (1) a diversidade da espécie ao redor do mundo, (2) ausência de um reservatório ambiental significativo

do organismo infeccioso, (3) ocorrência rara de transmissão entre membros não familiares e, desta maneira, competição relativamente forte entre clones a qual irá selecionar clones mais capazes de garantir a sobrevivência em um outro hospedeiro e (4) mudanças na evolução, incluindo seleção periódica em um clone durante um longo período ocorre em humanos.

As pesquisas sobre a diversidade genética de periodontopatógenos revelam **(1)** ampla heterogeneidade dentro da espécie (van STEENBERGEN *et al.*, 1991; MÄTTÖ *et al.*, 1996a; MÄTTÖ *et al.*, 1996b; TEANPAISAN *et al.*, 1996; GONÇALVES, ROBITAILLE & MOUTON, 1999; TEANPAISAN, DOUGLAS & NITTAYANANTA, 2001), **(2)** ausência de tipos clonais predominantes associados com a doença (TEANPAISAN *et al.*, 1996; PEARCE *et al.*, 2001) e **(3)** demonstram estabilidade de clones mesmo após tratamento periodontal (TEANPAISAN *et al.*, 1996; MÄTTÖ *et al.*, 1996a; TEANPAISAN, DOUGLAS & NITTAYANANTA, 2001). Essas constatações podem sugerir que todos os clones constituintes de uma espécie são igualmente efetivos na colonização de sítios periodontais, pois o potencial de virulência não seria restrito a um clone em particular, em contraste com outras espécies verdadeiramente patogênicas.

Desta forma, pode-se especular que espécies envolvidas com a etiopatogenia da doença periodontal, como a *P. gingivalis* e *P. intermedia*, seriam membros comensais da microbiota bucal, agindo principalmente como patógenos oportunistas do que como um patógeno exógeno adquirido um pouco antes do início da doença (MÉNARD & MOUTON, 1995).

A natureza da infecção periodontal constitui um importante tópico na microbiologia bucal. Seriam essas espécies bactérias exógenas, podendo ser transmitidas entre indivíduos e causar infecções verdadeiras, ou apenas microrganismos oportunistas aproveitando-se do ambiente favorável da doença periodontal para se multiplicarem? Esta questão pode influenciar diretamente o manejo terapêutico da doença periodontal, pois espécies exógenas podem ser completamente eliminadas da cavidade bucal, enquanto patógenos indígenas podem não ser suprimidos, mas permanecer em níveis compatíveis com a saúde do hospedeiro.

Uma vez que a análise clonal por AP-PCR não permite traçar marcadores genéticos de virulência bem definidos, deve-se aceitar a limitação do estudo da clonalidade na avaliação da virulência.

O emprego da técnica de AP-PCR para análise da diversidade genética de isolados de *P. intermedia* exige o cultivo prévio da espécie para obtenção dos isolados. A necessidade de cultivo de microrganismos pode introduzir um resultado tendencioso, pois pode ser que apenas cepas mais facilmente cultiváveis ou predominantes sejam analisadas (LEYS *et al.*, 1999). Adicionalmente, a técnica de AP-PCR requerer a utilização de cultura pura, uma vez que microrganismos contaminantes podem mudar drasticamente o perfil de amplificação. Também, a presença de plasmídio em cepas a serem analisadas pode influenciar os resultados da técnica (CHEN & SLOTS, 1994).

Com base nestas limitações, a investigação da presença de múltiplas cepas de *P. intermedia* diretamente das amostras clínicas subgengivais iniciais foi realizada por meio da análise heteroduplex de produtos amplificados por PCR utilizando *primer* espécie específico para essa espécie.

A análise heteroduplex mostrou-se uma técnica relativamente fácil, rápida, reprodutível e sensível para detectar fragmentos de DNA não complementares. A análise revelou a presença de uma a três diferentes cepas de *P. intermedia* presentes nas amostras clínicas subgengivais. Este resultado foi similar ao obtido por LEYS *et al.* (1999) que analisaram a presença de múltiplas cepas de *P. gingivalis*, com a maioria das amostras contendo duas cepas distintas.

Os resultados da genotipagem por AP-PCR e a investigação de cepas distintas de *P. intermedia* presentes nas amostras clínicas iniciais pela análise heteroduplex foram semelhantes, ou seja, os indivíduos com doença periodontal abrigaram pequeno número de tipos clonais da espécie *P. intermedia*. Portanto, a aplicação de técnicas que trabalham diretamente com a amostra clínica, abolindo a etapa de cultivo de microrganismos, talvez possam ser mais amplamente empregadas na investigação da diversidade genética de periodontopatógenos.

Certamente uma multiplicidade complexa de fatores influencia o padrão de colonização microbiana da cavidade bucal. Provavelmente determinantes da colonização incluem fontes de transmissão de patógenos, gênero, fatores sistêmicos, idade, etnia, variação demográfica, predisposição genética, fumo, frequência de consulta odontológica, padrão sócio-econômico, interação intra- e

inter- espécies bacterianas, hábitos de higiene bucal e outros. Portanto a composição da microbiota bucal em humanos depende em grande extensão de fatores genéticos e ambientais, numa abrangência maior do que se reconhecia anteriormente (ELLWOOD *et al.*, 1997).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, permitem concluir, respeitando os limites da metodologia aplicada:

1. As espécies do grupo de anaeróbios produtores de pigmento negro são mais prevalentes e freqüentes em sítios com bolsa periodontal do que em sítios saudáveis de indivíduos com periodontite, correlacionando-se positivamente com sangramento à sondagem;

2. Existe correlação significativa entre a detecção de *P. intermedia* e a profundidade de sondagem;

3. Indivíduos com doença periodontal são colonizados por poucos tipos clonais de *P. intermedia*, sendo que o aumento da profundidade de sondagem é acompanhado pelo aumento do número de genótipos;

4. Tipos clonais idênticos não são encontrados entre diferentes indivíduos, assim como, entre sítios com e sem destruição periodontal em um mesmo indivíduo;

5. A análise heteroduplex de produtos amplificados por PCR é um método eficiente para pesquisar tipos clonais de *P. intermedia* diretamente da amostra clínica e revelou coincidência com a técnica de AP-PCR.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOFORADO, G. A. P., MCKAY, T. L. & SLOTS, J. Rapid method for detection of lactose fermentation oral microorganisms. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.2, p.35-38, 1987.

ASHIMOTO, A. *et al.* Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v.11, n.4, p.266-273, Aug. 1996.

BAKER *et al.* Heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the induction of alveolar bone loss in mice. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, n.1, p.27-32, Dec. 2000.

BENKIRANE, H. L., GUILLOT, E. & MOUTON, C. Immunomagnetic PCR and DNA probe for detection and identification of *Porphyromonas gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, p.2908-2912, 1995.

CHEN, C. & SLOTS, J. Clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* by the arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.9, p.99-103, 1994.

DAHLÉN, G. *et al.* Putative periodontopathogens in “diseased” and “non-diseased” persons exhibiting poor oral hygiene. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.19, n.10, p.35-42, Nov. 1992.

DORN, B. R. & LEUNG, K. L. & PROGULSKE-FOX, A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 66, n. 12, p. 6054-6057, Dec. 1998.

DOYLE, J. J. T. & DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-18, 1990.

ELLWOOD, R. *et al.* Prevalence of suspected periodontal pathogens identified using ELISA in adolescents of differing ethnic origins. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.24, n.3, p.141-145, Mar. 1997.

FINEGOLD, S. M. & BARNES, E. M. Report of the ICSB taxonomic subcommittee on Gram-negative anaerobic rods. Proposal that the saccharolytic and asaccharolytic strains at present classified in the species *Bacteroides melaninogenicus* (Oliver & Wherry) be classified in two species as *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides asaccharolyticus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.67, p.291-7, 1977 apud OLSEN, I., SHAH, H. N. & GHARBIA, S.E. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontology** 2000, Copenhagen, v.20, p.14-52, 1999.

FRINLAY, B. B. & FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.53, p.210-230, 1989.

FOURNIER, D. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* sp. nov., anaerobic, gram-negative coccobacillus from the gingival sulcus of various animal hosts. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p.1179-1189, May 2001.

FRANDSEN E. V. *et al.* Evidence of recombination in *Porphyromonas gingivalis* and random distribution of putative virulence markers. **Infect. Immun.**, Washington, v.69, n.7, p.4479- 4485, Jul. 2001.

FUNKUI *et al.* Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* carriage among family members with subclinical periodontal disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3141-3145, Oct. 1999.

GMÜR, R. & GUGGENHEIM, B. Antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius* as recognized by monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, Washington, v.42, n.2, p.459-470, Nov. 1983.

GONÇALVES, R. B., ROBITAILLE, M. & MOUTON, C. Identical clones types of *Porphyromonas gingivalis* or *Prevotella nigrescens* recovered from infected root canals and subgingival plaque. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.14, p.197-200, 1999.

JOHNSON, J. L. & HOLDEMAN, L. V. *Bacteroides intermedius* comb. nov. and descriptions of *Bacteroides corporis* sp. nov. and *Bacteroides levii* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.33, n.1, p.15-25, Jan. 1983.

JOUSIMIES-SOMER, H. R. Update on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristics of pigmented anaerobic gram-negative rods. **Clin Infect. Dis.**, v.20, p.S187-S191, June 1995. Suppl.2.

KLEIN, M. I. Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipos de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus sobrinus*: estudo longitudinal em crianças. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de

Odontologia de Piracicaba, 2003.

KÖNÖNEN, E. *et al.* Transmission of oral *Prevotella melaninogenica* between a mother and her young child. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.9, n.5, p.310-314, Oct. 1994.

KÖNÖNEN, E. *et al.* Phylogenetic characterization and proposal of a new pigmented species to the genus *Prevotella*: *Prevotella pallens* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.48, n.1, p.47-51, Jan. 1998.

LAMELL, C. W. *et al.* Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. **J. clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.3, p.1196-1199, Mar. 2000.

LAMONT, R. J. & JENKINSON, H. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, n.4, p.1244-1263, Dec. 1998.

LEYS, E. J. *et al.* Identification of *Porphyromonas gingivalis* strains by heteroduplex analysis and detection of multiple strains. **J. clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.12, p.3906-3911, Dec. 1999.

LI, Y. & CAUFIELD P. W. Arbitrarily primed chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. **Oral Microbiol Immunol.**, Copenhagen, v.13, n.1, p.17-22, Feb. 1998.

LÖE, H., THEILADE, E. & JENSEN, S. A. Experimental gingivitis in man. **J. Periodont.**, Chicago, v.36, n.3, p.177-187, May/Jun. 1965.

LOSS, B. G. *et al.* Genetic heterogeneity of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by genomic DNA fingerprinting. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.69, n.8, p.1488-1493, Aug. 1990.

MAEDA, N. *et al.* Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v.42, n.9, p.583-589, Sept. 1998.

MAIDEN, M. F. J., TANNER, A. & MACUCH P. J. Rapid characterization of periodontal bacterial isolates by using fluorogenic substrate tests. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, p.376-384, 1996.

MÄTTÖ, J. *Et al.* Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.11, p.96-102, 1996 a.

MÄTTÖ, J. *et al.* Similarity of salivary and subgingival *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.11, p.395-401, 1996 b.

MAYRAND, D.; HOLT, S. C. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.52, n.11, p.134-52, Mar. 1982.

McNABB, H. *et al.* Periodontal pathogens in the shallow pockets of immigrants from developing countries. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.7, n.5, p.267-272, Oct. 1992.

MENARD, C. & MOUTON, C. Clonal diversity of the taxon *Porphyromonas gingivalis* assessed by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, n.7, p.2522-2531, July 1995.

MOMBELLI, A. *et al.* Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. **J. Periodont.**, Chicago, v.71, n.1, p.14-21, Jan. 2000.

OLIVER, W. W.; WHERRY, W. B. Notes on some bacterial parasites of the human mucous membranes. **J. Infect. Dis.**, v.28, p.341-345, 1921.

OLSEN, I.; SHAH, H. N.; GHARBIA, S.E. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v.20, p.14-52, 1999.

ÖZMERİÇ, N., PREUS, H. R. & OLSEN, I. Genetic diversity of *Porphyromonas gingivalis* and its possible importance to pathogenicity. **Acta. Odontol. Scand.**, Copenhagen, v.58, n.4, p.183-187, Aug. 2000.

PINAR, A. *et al.* The use of heteroduplex analysis of polimerase chain reaction products to support the possible transmission of *Legionella pneumophila* from a malfunctioning automobile air conditioner. **Infect Control Hosp. Epidemiol.**, v. 23, n. 3, p. 145-147, Mar. 2002.

RIVIERE, G., R. & DeROUEN, T., A. Association of oral spirochetes from periodontally healthy sites with development of gingivitis. **J. Periodont.**, Chicago, v.69, n.4, p.496-501, Apr. 1998.

ROSA, E. A. R. Uso da eletroforese de enzimas constitutivas na caracterização interespecífica de leveduras orais. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2000.

ROSA, R.T. Detecção de polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados de indivíduos livres de cárie (CPOD=0). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2001.

RUBIRA, I. R. F. Pesquisa de bactérias bucais em amostras de placa subgingival de indivíduos com periodonto normal e de portadores de periodontite através da técnica do "slot immunoblot". Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru.

SAWYER, S. J., MAC DONALD, J. B. & GIBBONS, R. J. Biochemical characteristics of *Bacteroides melaninogenicus*. A study of thirty-one strains. **Arch. oral Biol.**, Oxford, v.7, n.6, p.685-691, Nov./Dec. 1962.

SHAH, H. N. & COLLINS, M. D. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.40, n.2, p.205-8, Apr. 1990.

SHAH, H. N. & GHARBIA, S. E. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.42, n.4, p.542-546, Oct. 1992.

SLOTS, J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.84, n.1, p.1-10, 1976.

SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease. **J. Clin. Periodont.**, Copenhagen, v.6, n.5, p.351-382, May/Jun. 1979.

SLOTS, J. Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescent assay for trypsin-like activity. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.2, p.139-141, 1987.

SNEATH, P. H.A. & SOKAL, R. R. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco, p.230-234, 1973.

SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J. Periodont.**, Chicago, v.63, n.4, p.322-331, Apr. 1992 /Supplement/

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v.5, p.7-25, 1994.

SOCRANSKY, S. S., SMITH, C. & HAFFAJEE, A. D. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. **J. Clin. Periodont.**, Copenhagen, v.29, p.260-268, 2003.

SOCRANSKY, S. S. *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodont.**, Copenhagen, v.25, n.2, p.134-144, Feb. 1998.

SOCRANSKY, S. S. *et al.* Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. **Periodontology** 2000, Copenhagen, v.20, p.341-362, 1999.

STUBBS, S. *et al.* Direct detection of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in suppurative oral infection by amplification of 16S Rrna gene. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 1017-1022, 1999.

SYED S. A. & LOESCHE, W. J. Survival of human dental plaque flora in various transport media. **Appl Microbiol.**, v. 24, n. 4, p. 638-644, Oct. 1972.

TEANPAISAN R., DOUGLAS, C. W. I. & NITTAYANANTA, W. Isolation and genotyping of black-pigmented anaerobes from periodontal sites of HIV-positive and non-infected subjects in Thailand. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v. 28, p. 311-318, 2001.

TEANPAISAN, R.; DOUGLAS, C. W. I. & WALSH, T. F. Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.30, n.4, p.245-251, July 1995.

TEANPAISAN, R. *et al.* Clonality of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from periodontally diseased and healthy sites. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v. 31, p. 423-432, 1996.

TIMMERMAN, M. F. *et al.* Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Clinical and microbiological baseline data. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, v.25, n.3, p.215-224, Mar. 1998.

TURNER, S. J. *et al.* A heteroduplex method for detection of targeted sub-populations of bacterial communities. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 208, n. 1, p. 9-13, Feb. 2002.

van STEENBERGEN, T. J. M. *et al.* Microflora and bacterial DNA restriction enzyme analysis in young adults with periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, n. 4, p. 235-241, Apr. 1991.

van STEENBERGEN, T. J. M. *et al.* Intra-familial transmission and distribution of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v. 32, n. 4, p. 345-350, May 1997.

van WINKELHOFF *et al.* *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and

other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.29, p.1023-1028, 2002.

WELSH, J. & McCLELLAND, D. L. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, Dec. 1990.

WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, Nov. 1990.

ANEXO 1- Aprovação do comitê de ética em pesquisa para a realização do presente estudo



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Análise genética de *porphyromonas gingivalis*", sob o protocolo nº 134/2001, da Pesquisadora **Ana Cláudia Braga Amoras Alves**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 17 de dezembro de 2001

We certify that the research project with title "GENETICS ANALYSIS OF *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*", protocol nº 134/2001, by Researcher **Ana Cláudia Braga Amoras Alves**, responsibility by Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

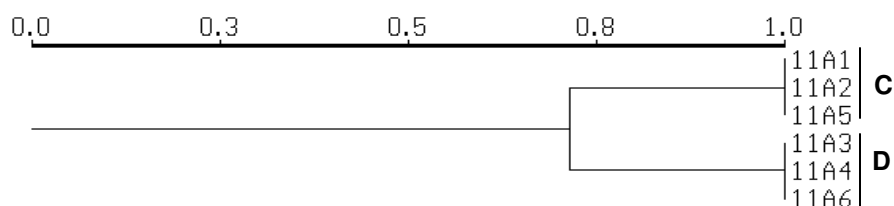
Piracicaba, SP, Brazil, December 17 2001

Ana Cláudia Braga Amoras Alves
 Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP

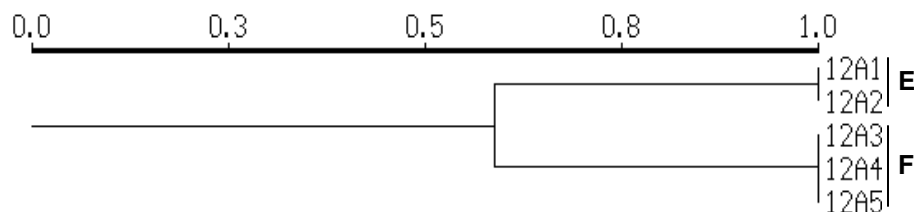
Antonio Bento Alves de Moraes
 Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

ANEXO 2- Dendogramas representativos dos diferentes genótipos de *P. intermedia* detectados em sítios com e sem destruição periodontal de indivíduos com periodontite. As letras A ou B indicam o sítio de isolamento, acompanhado pelo número do isolado e os genótipos foram codificados por letras maiúsculas.

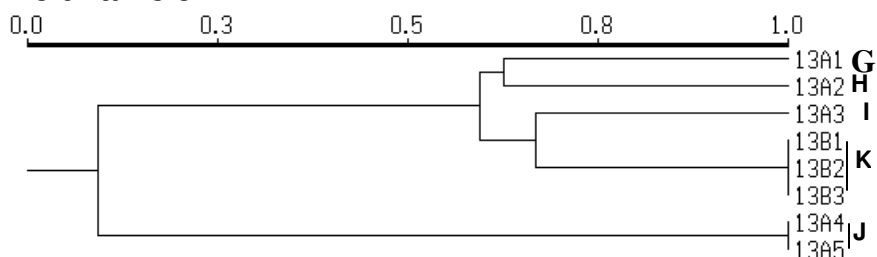
Voluntário 1



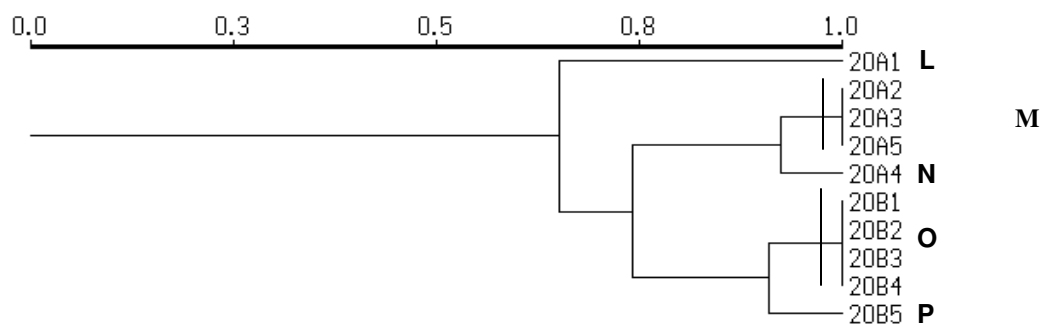
Voluntário 2



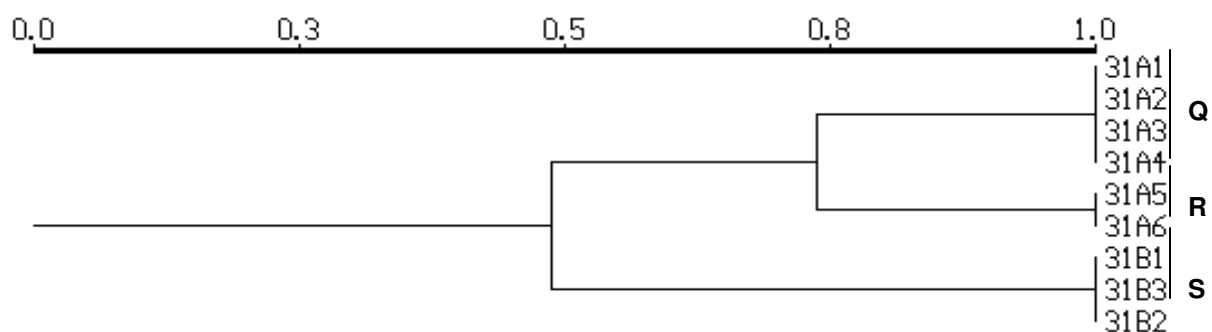
Voluntário 3



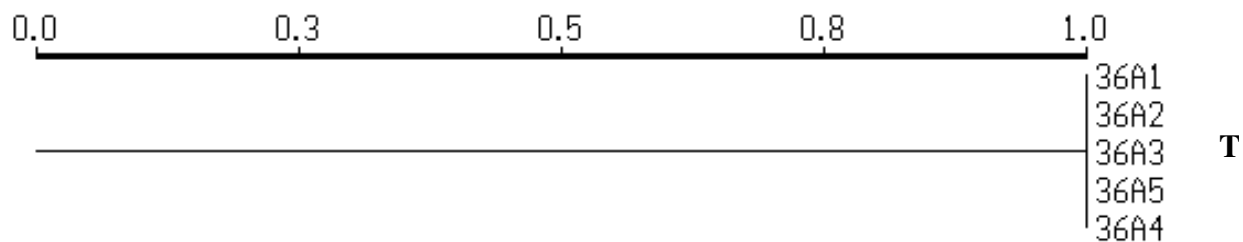
Voluntário 4



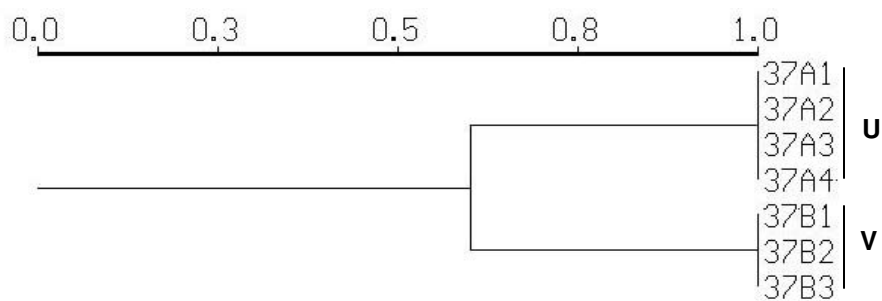
Voluntário 5



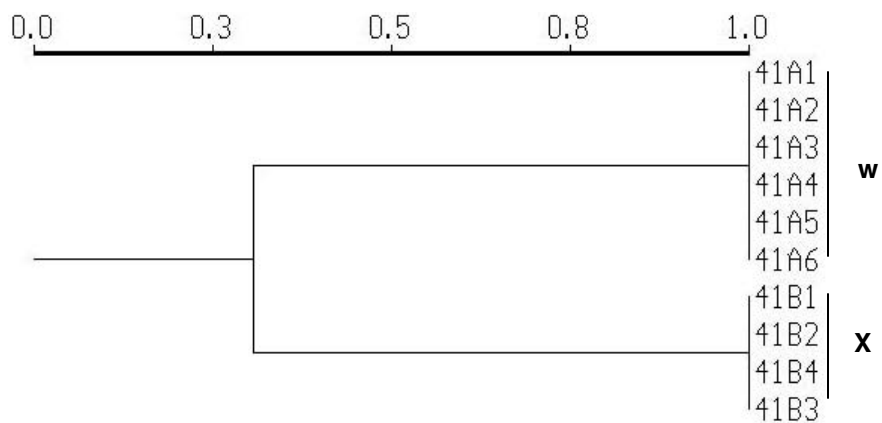
Voluntário 6



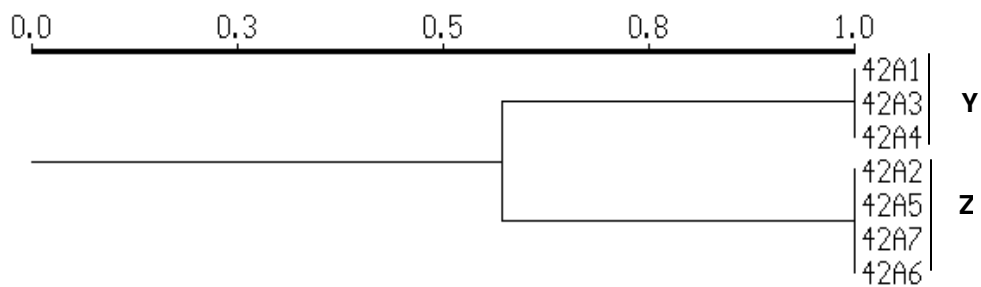
Voluntário 7



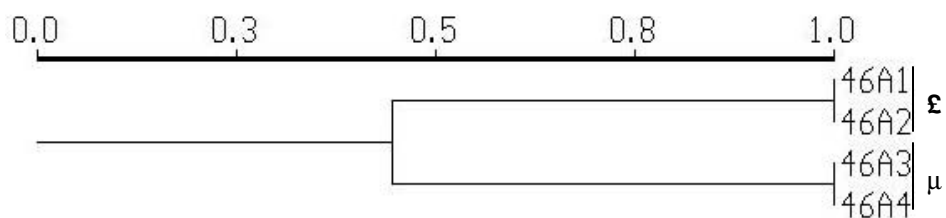
Voluntário 8



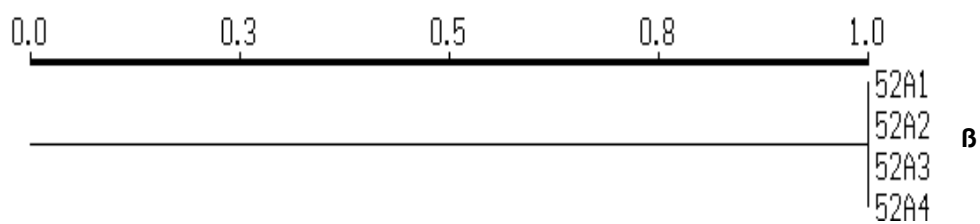
Voluntário 9



Voluntário 10



Voluntário 11



Voluntário 12

