

**MARCELO DE FAVERI**

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

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

São Paulo  
2007

**MARCELO DE FAVERI**

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

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves  
Mayer

São Paulo  
2007

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

---

**Candidato:** Marcelo de Faveri

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

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

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

**( ) Aprovado      ( ) Reprovado**

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

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

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

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

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

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jair e Neide,

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

## **AGRADESCIMENTO ESPECIAIS**

### **À DEUS**

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

### **À Profa. Dra. Marcia Mayer**

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

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

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

# Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Resumo

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

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

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

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



## Abstract

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

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

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

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

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

