

DETERMINAÇÃO DO MELHOR MÉTODO DE COLETA DA MICROBIOTA PERIODONTAL PARA O SEQUENCIAMENTO DE DNA METAGENÔMICO EM PLATAFORMAS DE ALTO RENDIMENTO

Paula Juliana Pérez-Chaparro, Magda Feres- Pós-doutorado; programa de pós-graduação em Odontologia - julianaperezch@gmail.com

RESUMO

A periodontite é uma doença infecciosa de natureza polimicrobiana e o sucesso do tratamento periodontal depende da identificação dos patógenos associados com a etiologia dessas infecções. Nesse sentido, o recente desenvolvimento das técnicas de sequenciamento direto de DNA metagenômico de alto rendimento abriu novos horizontes na busca por novas espécies de microorganismos relacionados à saúde ou à doença periodontal. Um dos problemas associados com essa técnica é a grande quantidade de DNA humano que pode estar presente na amostra, o que pode prejudicar a detecção bacteriana. Como essas técnicas são relativamente recentes, principalmente em periodontia, atualmente não existe um consenso em relação a melhor forma de realizar a coleta de placa subgengival para o sequenciamento do DNA metagenômico em plataformas de alto rendimento, visando minimizar a inclusão de DNA humano. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi determinar o melhor método de coleta de placa subgengival, com cone de papel ou com cureta, para se obter a maior proporção de DNA bacteriano para o posterior sequenciamento em plataformas de alto rendimento. Foram selecionados para o estudo três indivíduos periodontalmente saudáveis e três indivíduos com periodontite crônica. Foram coletadas 3 e 9 amostras da placa subgengival dos indivíduos saudáveis e com periodontite, respectivamente. As coletas foram realizadas em duplicata, a primeira com cones de papel e a segunda com curetas *Gracey Mini Five 11/12*. A extração de ácidos nucleicos foi realizada empregando o kit de extração *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit*. A concentração de DNA de Humano, de Arqueia e de Bactéria foi calculada usando a reação de cadeia de polimerase quantitativa, utilizando iniciadores específicos para genes constitutivos e exclusivos de Arqueia e de humano. No geral, as coletas realizadas com cureta apresentaram menores proporções de DNA humano do que as coletadas feitas com cone de papel. Essa diferença foi estatisticamente significativa para todos os sítios nos indivíduos com periodontite crônica e também para os sítios profundos ($p < 0,05$). Por outro lado, 16 amostras coletadas com cone apresentavam mais de 20% de DNA humano, enquanto apenas 9 das amostras coletadas com cureta estavam nessa categoria. Os dados desse estudo sugerem que curetas *Gracey Mini Five 11/12* representam um melhor método de coleta de amostras de placa subgengival para o sequenciamento de DNA bacteriano em plataformas de alto rendimento, em comparação com cones de papel.

DESCRITORES: Reação em Cadeia por Polimerase; sequenciamento de alto rendimento; metagenôma; microbiota periodontal.

Aprovação CEP CAAE 16380813.4.3001.0019
Projeto elaborado com o Apoio da FAPESP processo 2012/20915-0