

LUCAS JOSÉ SOARES SANTIAGO

DETERMINAÇÃO DE HOSPEDEIROS PARA BACTÉRIAS EPIBIONTES DO GÊNERO  
*Saccharibacteria* ISOLADAS DO BIOFILME DENTAL OU SUBGENGIVAL



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como pré-requisito para a obtenção do  
grau de Bacharel em ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GOÉS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO / 2024

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Ana Paula Vieira Colombo e coorientação de Lélia Lima Araújo**

**FICHA CATALOGRÁFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

S235d Santiago, Lucas José Soares  
Determinação de Hospedeiros para Bactérias  
Epibiontes do Gênero Saccharibacteria Isoladas do  
Biofilme Dental ou Subgingival / Lucas José Soares  
Santiago. -- Rio de Janeiro, 2024.  
47 f.

Orientadora: Ana Paula Vieira Colombo.  
Coorientadora: Lélia Lima Araújo.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. Saccharibacteria. 2. Fusobacterium nucleatum.  
3. Parvimonas micra. 4. Biofilme. 5. Periodontite.  
I. Colombo, Ana Paula Vieira, orient. II. Araújo,  
Lélia Lima, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## Ata de Defesa Assinada

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): **Lucas José Soares Santiago**

DRE: **121062000**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Marinella Silva Laport (Presidente)  
 Prof. Karla Rodrigues Miranda  
 MSc. Andressa Temperine de Oliveira Marre  
 Prof. Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Título da Monografia: **“DETERMINAÇÃO DE HOSPEDEIROS PARA BACTÉRIAS EPIBIONTES DO GÊNERO *Saccharibacteria* ISOLADAS DO BIOFILME DENTAL OU SUBGENGIVAL”**

Local: **Sala de Seminários / IMPG / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **04 de dezembro de 2024 às 10:00h**

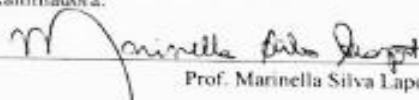
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 04 de dezembro de 2024.

NOTA:

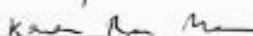
Banca Examinadora:

9,5



Prof. Marinella Silva Laport (Presidente)

9,5



Prof. Karla Rodrigues Miranda

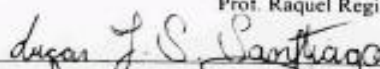
9,5



MSc. Andressa Temperine de Oliveira Marre

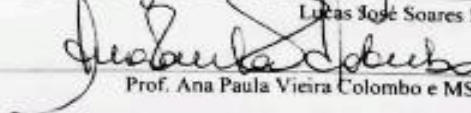
Prof. Raquel Regina Bonelli (Suplente)

Aluno(a):



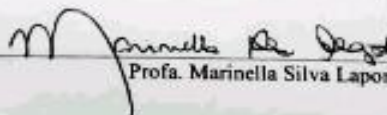
Lucas José Soares Santiago

Orientador(a)  
(e coorientador):



Prof. Ana Paula Vieira Colombo e MSc. Lélia Lima Araújo

Coordenadora de  
TCC:



Prof. Marinella Silva Laport

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó, que cuidou de mim desde pequeno. Infelizmente, ela não estará presente para encerrar mais um ciclo, mas acredito que esteja cuidando de mim mesmo de longe.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, já que sem Ele nada disso teria sido possível;

Agradeço também a minha mãe, que desde cedo lutou para que eu tivesse tudo que precisasse e pudesse me dedicar aos estudos;

Agradeço à minha avó, que cuidou de mim em todas as etapas da minha vida, me moldando no homem que sou hoje;

Agradeço à minha namorada, Júlia Morgado, que sempre me motiva, me apoia e me ajuda a superar todas as adversidades ao longo dessa trajetória;

Agradeço os meus colegas de trabalho, em especial minha Orientadora Ana Paula Vieira Colombo e Co-orientadora Lélia Lima Araújo, que sempre estiveram à disposição para me ajudar;

Agradeço aos meus amigos da graduação, que vivenciaram ao meu lado todos os desafios associados à nossa formação. Júlia Morgado, Júlia Malerbi, Johnatha, Isabela, Karen e Maria Eduarda;

Agradeço também aos meus amigos de longa data, integrantes do grupo “Camas”, que mesmo de longe me ajudaram a enfrentar todas as dificuldades da graduação;

Agradeço também ao CENABIO e à UNIMICRO por possibilitarem os experimentos de microscopia empregados nesta tese.

*“It's better to suffer studying than to regret never having studied”*

(Aka Akasaka)

## RESUMO

LUCAS JOSÉ SOARES SANTIAGO

### DETERMINAÇÃO DE HOSPEDEIROS PARA BACTÉRIAS EPIBIONTES DO GÊNERO *Saccharibacteria* ISOLADAS DO BIOFILME DENTAL OU SUBGENGIVAL

Orientador: Ana Paula Vieira Colombo

Coorientador: Lélia Lima Araújo

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O gênero *Saccharibacteria* compreende pequenas bactérias, encontradas em diversos ambientes, inclusive na microbiota oral humana. Nesse habitat, diferentes cepas estão associadas ao biofilme dental de sítios orais saudáveis, bem como de lesões inflamatórias presentes nas doenças periodontais (DP). Membros desse gênero necessitam estabelecer uma relação de epibiose com seus hospedeiros para se replicar, pois devido ao seu reduzido genoma, carecem de inúmeras vias biossintéticas essenciais para sua propagação. Apenas algumas cepas orais de *Saccharibacteria* foram co-cultivadas com hospedeiros, geralmente comensais da microbiota oral, tais como espécies dos gêneros *Arachnia* e *Schaalia*. Porém, pouco se sabe sobre o papel de *Saccharibacteria* no microambiente inflamatório associado às DP. Nossa hipótese propõe que, no biofilme disbiótico associado às DP, patógenos periodontais presentes em alta abundância podem exercer o papel de hospedeiros para cepas específicas de *Saccharibacteria*. Assim, nosso objetivo foi identificar as cepas de *Saccharibacteria* mais prevalentes no biofilme disbiótico de pacientes com DP, bem como avaliar *in vitro* a capacidade dos patógenos periodontais *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra* de atuarem como hospedeiros das cepas identificadas. Amostras de biofilme subgengival obtidas de indivíduos com diferentes condições periodontais, atendidos na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram cultivadas em anaerobiose. A presença de *Saccharibacteria* spp. foi avaliada através da amplificação por PCR da subunidade 16S do gene ribossomal (16S rRNA) para este gênero. 77 amostras de biofilme positivas foram filtradas (em filtro de 0,22 $\mu$ ) para o isolamento de *Saccharibacteria* spp. O DNA desses isolados foi obtido para amplificação do gene do 16S rRNA através da *Nested* PCR, e os amplicons sequenciados pelo método de Sanger. Dentre as 54 cepas clínicas isoladas e sequenciadas, observou-se uma alta prevalência dos filotipos HMT-346, HMT-869 e HMT-349, presentes em >80% das amostras de biofilme analisadas. Em menor frequência, encontramos as cepas HMT-952 (14%), HMT-957 (10%), HMT-955 (8%), HMT-488 (4%) e HMT-352 (4%). Em seguida, *F. nucleatum* e *P. micra*, bem como *A. propionica* e *S. odontolytica* foram testados em co-cultura como potenciais hospedeiros para as cepas clínicas de *Saccharibacteria* mais prevalentes. Nas condições de co-cultivo *in vitro* aplicadas, nenhuma das bactérias hospedeiras testadas suportou o crescimento das cepas clínicas. Entretanto, a capacidade dessas espécies de atuarem como hospedeiros não deve ser descartada. Novas condições metodológicas necessitam ser testadas para confirmar a capacidade das bactérias aqui propostas atuarem como hospedeiros eficientes para as cepas de *Saccharibacteria* identificadas.

**Palavras-chave:** *Saccharibacteria*; *Fusobacterium nucleatum*; *Parvimonas micra*; Epibionte; Periodontite; Biofilme

## ABSTRACT

LUCAS JOSÉ SOARES SANTIAGO

### DETERMINATION OF HOSTS FOR EPIBIONT BACTERIA OF THE GENUS *Saccharibacteria* ISOLATED FROM DENTAL OR SUBGINGIVAL BIOFILM

Orientador: Ana Paula Vieira Colombo

Coorientador: Lélia Lima Araújo

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The *Saccharibacteria* genus comprises small bacteria found in a variety of environments, including the human oral microbiota. In this habitat, different strains are associated with the dental biofilm of healthy oral sites, as well as inflammatory lesions present in periodontal diseases (PD). Members of this genus need to establish an epibiotic relationship with their hosts in order to replicate, because due to their short genome, they lack numerous biosynthetic pathways that are essential for their propagation. Only a few oral strains of *Saccharibacteria* have been co-cultured with hosts, usually commensals of the oral microbiota, such as species of the genera *Arachnia* and *Schaalia*. However, little is known about the role of *Saccharibacteria* in the inflammatory microenvironment associated with PD. Our hypothesis proposes that, in the dysbiotic biofilm associated with PD, periodontal pathogens present in high abundance may play the role of hosts for specific strains of *Saccharibacteria*. Thus, our aim was to identify the most prevalent *Saccharibacteria* strains in the dysbiotic biofilm of PD patients, as well as to evaluate *in vitro* the ability of the periodontal pathogens *Fusobacterium nucleatum* and *Parvimonas micra* to act as hosts for the identified strains. Samples of subgingival biofilm obtained from individuals with different periodontal conditions, seen at the Periodontics Clinic of the School of Dentistry of the Federal University of Rio de Janeiro, were cultured in anaerobiosis. The presence of *Saccharibacteria* spp. was assessed by PCR amplification of the 16S subunit of the ribosomal gene (16S rRNA) for this genus. 77 positive biofilm samples were filtered (on a 0.22 $\mu$  filter) for the isolation of *Saccharibacteria* spp. DNA from these isolates was obtained for amplification of the 16S rRNA gene using *Nested* PCR, and the amplicons sequenced using the Sanger method. Among the 54 clinical strains isolated and sequenced, there was a high prevalence of the HMT-346, HMT-869 and HMT-349 phylotypes, present in >80% of the biofilm samples analyzed. Less frequently, we found the strains HMT-952 (14%), HMT-957 (10%), HMT-955 (8%), HMT-488 (4%) and HMT-352 (4%). Next, *F. nucleatum* and *P. micra*, as well as *A. propionica* and *S. odontolytica* were tested in co-culture as potential hosts for the most prevalent clinical strains of *Saccharibacteria*. Under the *in vitro* co-cultivation conditions applied, none of the host bacteria tested supported the growth of the clinical strains. However, the ability of these species to act as hosts should not be ruled out. New methodological conditions need to be tested to confirm the ability of the bacteria proposed here to act as efficient hosts for the *Saccharibacteria* strains identified.

**keywords:** *Saccharibacteria*; *Fusobacterium nucleatum*; *Parvimonas micra*; Epibiont; Periodontitis; Biofilm

## RESUMO PARA LEIGOS

LUCAS JOSÉ SOARES SANTIAGO

### ESTUDO SOBRE POSSÍVEIS NOVAS BACTÉRIAS, ENCONTRADAS NA CAMADA BACTERIANA FORMADA NOS DENTES, CAPAZES DE ABRIGAR *Saccharibacteria* EM SUA SUPERFÍCIE

Orientador: Ana Paula Vieira Colombo

Coorientador: Lélia Lima Araújo

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O grupo de bactérias chamado *Saccharibacteria* é formado por microrganismos muito pequenos que vivem sobre a superfície de outras bactérias. Esses microrganismos têm sido encontrados em camadas bacterianas que se formam sobre os dentes (popularmente conhecidas como placa dental ou tártaro), mas os cientistas ainda estão estudando se eles são prejudiciais ou benéficos para a saúde bucal. Nosso estudo buscou identificar quais as bactérias patogênicas encontradas em grandes quantidades na placa dental associada às doenças da gengiva conseguem "abrigar" *Saccharibacteria*, ou seja, conseguem servir de suporte para elas viverem. Descobrimos que alguns tipos específicos de *Saccharibacteria* são comuns em pessoas com doenças gengivais graves, o que pode indicar uma ligação com essas doenças. Testamos se esses tipos de *Saccharibacteria* conseguiam crescer juntamente com patógenos das doenças gengivais, como *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra*, além das bactérias que normalmente abrigam *Saccharibacteria* em outras partes da boca. Através dos experimentos aqui realizados, nenhuma das bactérias patogênicas conseguiu suportar o crescimento das espécies de *Saccharibacteria* isoladas da placa bacteriana dos pacientes. Porém, essa possibilidade não pode ser ainda descartada, pois novos experimentos com diferentes técnicas necessitam ser realizados para confirmar esses achados. Acreditamos que o conhecimento sobre essas relações entre bactérias contribuirá para um melhor entendimento sobre a causa das doenças gengivais, e para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

## ÍNDICE

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
RESUMO PARA LEIGOS .....	x
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Gênero <i>Saccharibacteria</i> .....	1
1.2 Relação de Epibiose entre <i>Saccharibacteria</i> sp. e Bactérias Orais .....	2
1.3 Bactérias Orais Hospedeiras .....	3
1.4 Doenças Periodontais .....	4
1.5 Patógenos Periodontais .....	5
1.6 <i>Fusobacterium nucleatum</i> e <i>Parvimonas micra</i> Como Possíveis Hospedeiros .....	7
2 JUSTIFICATIVA .....	11
3 OBJETIVOS .....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
4.1 Fluxograma de Atividades .....	13
4.2 População do Estudo .....	13
4.3 Coleta de Amostras para Análise Microbiológica .....	14
4.4 Cultivo e Isolamento de <i>Saccharibacteria</i> .....	15
4.5 Identificação das Cepas de <i>Saccharibacteria</i> Isoladas do Biofilme Subgengival .....	16
4.6 Seleção das Cepas Clínicas de <i>Saccharibacteria</i> para Co-cultivo com Hospedeiros ..	17
4.7 Co-cultivo de <i>Saccharibacteria</i> sp. com Potenciais Hospedeiros Bacterianos Orais ..	17
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	18
5 RESULTADOS .....	20
5.1 Identificação dos Isolados Clínicos de <i>Saccharibacteria</i> sp. ....	20
5.2 Co-cultivo de <i>Saccharibacteria</i> sp. com os Candidatos a Hospedeiros .....	24
6 DISCUSSÃO .....	26
7 CONCLUSÃO .....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Gênero *Saccharibacteria*

O superfilo Patescibacteria, também conhecido como *Candidate phyla radiation* (CPR), engloba um grande número de bactérias conhecidas, na sua maioria ainda não cultiváveis (**Anexo 1**). Por isso, recebem uma nomenclatura taxonômica provisória, *Candidatus*. Dentre estas, cepas do gênero *Saccharibacteria* foram recentemente isoladas e cultivadas em co-culturas com espécies de *Actinomyces*, algumas atualmente reclassificadas no gênero *Schaalia* (He *et al.*, 2015; Bor *et al.*, 2020; Murugkar *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2022). O gênero *Saccharibacteria* compreende um grupo de bactérias minúsculas, medindo cerca de 200 a 300 nanômetros, com um genoma tão pequeno quanto, apresentando cerca de 699 a 705 kb (He *et al.*, 2015; Bor *et al.*, 2019, 2020). Por esse motivo, essas bactérias carecem de inúmeras vias biossintéticas necessárias para a vida, como a síntese de ácidos graxos, nucleotídeos, aminoácidos e cofatores vitamínicos, necessitando estabelecer relações de epísimbiose com bactérias hospedeiras para obter tais produtos (He *et al.*, 2015; Bor *et al.*, 2019, 2020). A necessidade de crescer com uma bactéria hospedeira dificultou o cultivo desse gênero por anos e, dessa forma, muitos aspectos de sua fisiologia e estilo de vida ainda não estão elucidados (Bor *et al.*, 2019).

Antes mesmo do seu cultivo e isolamento terem sido realizados pela primeira vez, a presença de *Saccharibacteria* já vinha sendo evidenciada em diversos estudos sobre microbiomas. Hoje em dia, sua presença é reportada em mares, solos, águas residuais, musgos e até mesmo em animais, sejam eles cupins ou mamíferos, como nós humanos (Hugenholtz *et al.*, 2001; Brinig *et al.*, 2003; Nakajima *et al.*, 2005; Marcy *et al.*, 2007; Dewhirst *et al.*, 2012; Dudek *et al.*, 2017; Starr *et al.*, 2018). Em relação aos humanos, a presença de *Saccharibacteria* já foi confirmada nas mucosas orais, intestinais e vaginais, além da pele. Essas bactérias estão presentes naturalmente na microbiota de pessoas saudáveis, mas também podem ser encontradas em sítios anatômicos associados a uma microbiota disbiótica e a quadros clínicos infecciosos/inflamatórios (Brinig *et al.*, 2003; He *et al.*, 2015; Bor *et al.*, 2019).

Devido a seu pequeno tamanho, a utilização de corantes comuns na bacteriologia, como a coloração de Gram, não pode ser empregada para visualização microscópica desses microrganismos. Dessa forma, a fim de se detectar a presença de *Saccharibacteria* em uma

determinada amostra, utilizam-se métodos de biologia molecular, como a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), associados à microscopia de contraste de fase, e hibridização fluorescente *in situ* associada à microscopia confocal (Bor *et al.*, 2017).

## 1.2 Relação de Epibiose entre *Saccharibacteria* sp. e bactérias orais

A relação entre *Saccharibacteria* sp. e seus hospedeiros se dá por meio de uma epibiose, relação ecológica na qual um organismo vive sobre a superfície de outro organismo. Diferentes cepas de *Saccharibacteria* sp. vão apresentar diferentes dinâmicas com seus hospedeiros, podendo atuar de forma mutualística ou predatória. A epibiose é uma etapa obrigatória na reprodução de *Saccharibacteria* sp. (He *et al.*, 2015; Bor *et al.*, 2017, 2019; Utter *et al.*, 2020).

Relações de epibiose obrigatórias são, geralmente, observadas em associações entre eucariotos e procariotos; no entanto, essa relação raramente é observada em associações entre procariotos. Isso não quer dizer que essas relações ecológicas não existam entre esses microrganismos, e sim que ainda não temos o conhecimento científico para identificar e cultivar esses simbiontes (Bor *et al.*, 2017). Um exemplo conhecido de epibiose obrigatória entre procariotos, além de *Saccharibacteria* sp., é o protagonizado por bactérias predadoras como *Micavibrio* e *Vampirococcus*. Nessa relação, as bactérias predadoras, aderidas à superfície de seus hospedeiros, sobrevivem às custas do conteúdo celular, levando à morte da célula hospedeira (Kadouri, Venzon e O'Toole, 2006; Bor *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2021). Diferente das bactérias predadoras, *Saccharibacteria* sp. é capaz de estabelecer uma relação íntima e contínua com seus hospedeiros, sem levar a sua morte imediata. Ainda assim, certas cepas de *Saccharibacteria* sp. podem assumir um papel mais predatório desde o início de sua relação, ou quando em ambientes de estresse, levando à morte do seu hospedeiro (Bor *et al.*, 2017).

Utter e colaboradores (2020) descreveram as interações entre a espécie *Nanosynbacter lyticus* (cepa TM7x HMT 952 do gênero *Saccharibacteria*) e diferentes hospedeiros do gênero *Actinomyces*, demonstrando que a relação parasito-hospedeiro é complexa e diferente do observado em outras relações epibióticas. Com seus estudos, esses pesquisadores estabeleceram os conceitos de hospedeiros “permissivos” e “não permissivos”, a partir das dinâmicas de crescimento observadas entre *Saccharibacteria* e seus hospedeiros (Utter *et al.*, 2020).

Hospedeiros permissivos são aqueles que, quando em interação com *N. lyticus*, passam por um evento chamado de *growth crash*. O *growth crash* consiste em uma queda acentuada da população do hospedeiro em paralelo com o aumento da quantidade de *N. lyticus*. Após esse evento, temos uma recuperação da população do hospedeiro, a qual se estabiliza e mantém um crescimento contínuo e estável com *N. lyticus* (Utter *et al.*, 2020). O momento onde teremos o *growth crash* é extremamente dependente da quantidade de inóculo da cepa de *Saccharibacteria* adicionada ao meio. Quanto maior a concentração, mais cedo ocorre a queda da população de hospedeiros. Além disso, a duração dessa queda drástica da população é dependente da cepa do hospedeiro. Algumas cepas de *Actinomyces* sp. apresentam quedas longas, enquanto outras se recuperam muito rapidamente (Utter *et al.*, 2020).

Hospedeiros não permissivos são aqueles que, quando em interação com a cepa *N. lyticus*, não sofrem o evento de *growth crash*. No geral, a população de *N. lyticus* demora mais a crescer na presença das cepas não permissivas. Além disso, esses hospedeiros não sustentam grandes quantidades de bactérias em sua superfície do mesmo modo como as cepas permissivas o fazem (Utter *et al.*, 2020).

Devido à interação com *N. lyticus*, as células das bactérias hospedeiras permissivas e não permissivas tendem a alongar o seu tamanho, permitindo maior contato físico e adesão ao epibionte *Saccharibacteria*. Esse crescimento pode, eventualmente, levar à lise da célula hospedeira (Utter *et al.*, 2020).

Estudos moleculares com cepas permissivas e não permissivas de *Actinomyces* sp. demonstraram diferenças na expressão de proteínas de membrana e de certos genes, tais como genes da família Mur ligase e de resistência à bacitracina, os quais estão presentes nas cepas não permissivas, e genes da família glicosiltransferase presentes apenas nas cepas permissivas. Entretanto, estudos mais aprofundados sobre essa temática são necessários para entender sua implicação no estabelecimento de cepas permissivas e não permissivas (Utter *et al.*, 2020).

### **1.3 Bactérias Oraís Hospedeiras**

Os hospedeiros de epibiontes de *Saccharibacteria* mais bem caracterizados são espécies dos gêneros *Actinomyces* e *Schaalia*, em particular *Schaalia odontolytica*, considerada a espécie hospedeira mais comum de *N. lyticus* (Bor *et al.*, 2020; Murugkar *et al.*, 2020). Os gêneros

*Actinomyces* e *Schaalia* compreendem bactérias residentes comumente encontradas na microbiota oral residente. Dentro do gênero *Actinomyces*, as bactérias são agrupadas em clados, e cada cepa de *Saccharibacteria* só consegue utilizar como hospedeiros bactérias de um dos dois clados existentes. Esses clados diferem entre si por meio de genes conservados. *A. viscosus* e *A. naeslundii* são dois representantes do clado 1, enquanto *Schaalia odontolytica* (antigo *A. odontolyticus*) e *A. meyeri* são exemplos do clado 2. (Abusleme *et al.*, 2013; Bor, *et al.*, 2018; Murugkar *et al.*, 2020; Utter *et al.*, 2020; Nie *et al.*, 2022). Outro gênero que também pode atuar como hospedeiro para *Saccharibacteria* é *Arachnia* (previamente classificada como *Propionibacterium*), em particular *A. propionica* e *A. rubra*, as quais também são comensais da microbiota oral (Murugkar *et al.*, 2020).

Até o momento, não existem relatos sobre bactérias orais patogênicas se comportarem como cepas hospedeiras de *Saccharibacteria*. Em condições de doença, como nas doenças periodontais (DP), o biofilme subgengival disbiótico associado à lesão periodontal é enriquecido com patógenos orais específicos, que na sua grande maioria são microrganismos anaeróbios, Gram-negativos e proteolíticos. Esse biofilme patogênico se desenvolve num microambiente inflamatório crônico, no qual também são detectadas vários filotipos de *Saccharibacteria* (Liu *et al.*, 2012; Abusleme *et al.*, 2013; Lourenço *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2019; Papapanou *et al.*, 2020; Chipashvili *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2023 e 2024). Logo, patógenos periodontais do biofilme associado à DP poderiam ser hospedeiros competentes para espécies de *Saccharibacteria* adaptadas a esse microambiente inflamatório disbiótico.

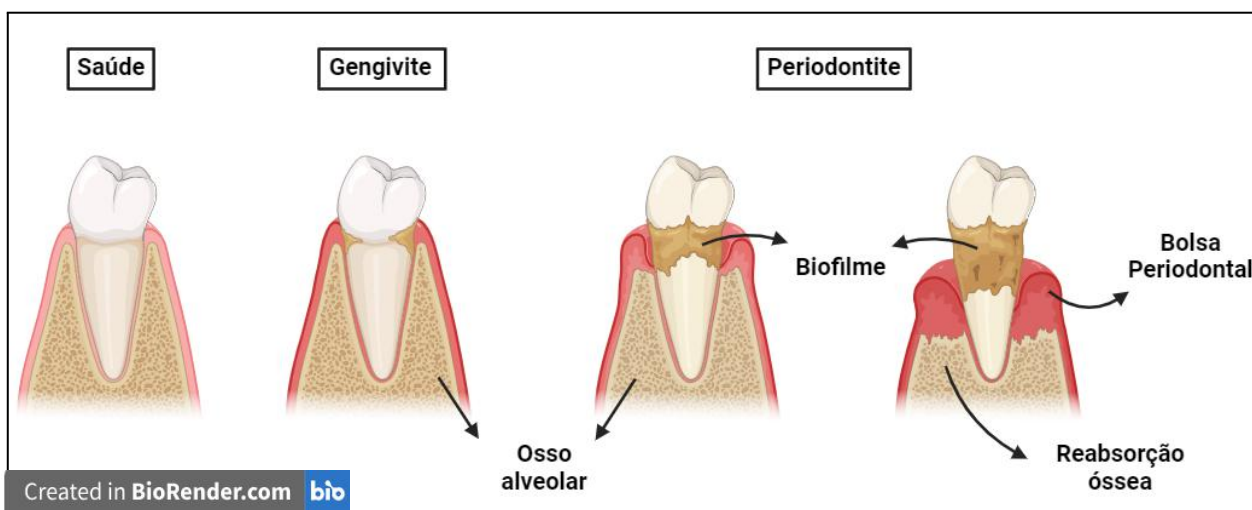
#### **1.4 Doenças Periodontais**

As DP são doenças inflamatórias crônicas, de natureza multifatorial, relacionadas ao estabelecimento de uma infecção polimicrobiana ocasionada por um biofilme disbiótico (Figura 1). Nesse estado, a resposta inflamatória exacerbada desencadeada pelo sistema imune contra o biofilme leva à destruição dos tecidos de proteção e sustentação dos dentes, o que pode acarretar na perda dos mesmos (Michaud *et al.*, 2017; Kwon, Lamster e Levin, 2021; Herrera *et al.*, 2024).

De forma geral, as DPs são divididas em dois grandes grupos: as doenças gengivais e as periodontites, com diferentes graus de gravidade, extensão e resposta terapêutica. As gengivites envolvem a inflamação da gengiva marginal, a qual está em íntimo contato com um biofilme

supragengival abundante; são condições reversíveis e menos graves que respondem à remoção mecânica do biofilme através da profilaxia dental. As periodontites são mais graves, pois são caracterizadas pela inflamação e destruição extensa e irreversível dos tecidos periodontais (Figura 1) (Michaud *et al.*, 2017; Herrera *et al.*, 2024).

Alterações significativas na abundância e prevalência de microrganismos orais específicos são observadas durante a transição de um quadro de saúde periodontal para gengivite, e desta para o estabelecimento de uma periodontite (Lamont, Hajishengallis e Koo, 2019). O biofilme subgengival associado à DP é extremamente complexo, compreendendo tanto espécies comensais como espécies patobiômicas. Essas espécies, mantidas em baixa abundância por membros residentes em condições de saúde, têm a capacidade de proliferar e atingir níveis muito altos quando há alteração no microambiente periodontal, como por exemplo, a má higiene bucal e o acúmulo do biofilme dental. Esses microrganismos têm a capacidade de evadir o sistema imune, bem como induzir uma resposta imune/inflamatória desregulada e persistente, que leva à destruição dos tecidos periodontais (Lamont, Hajishengallis e Koo, 2019).



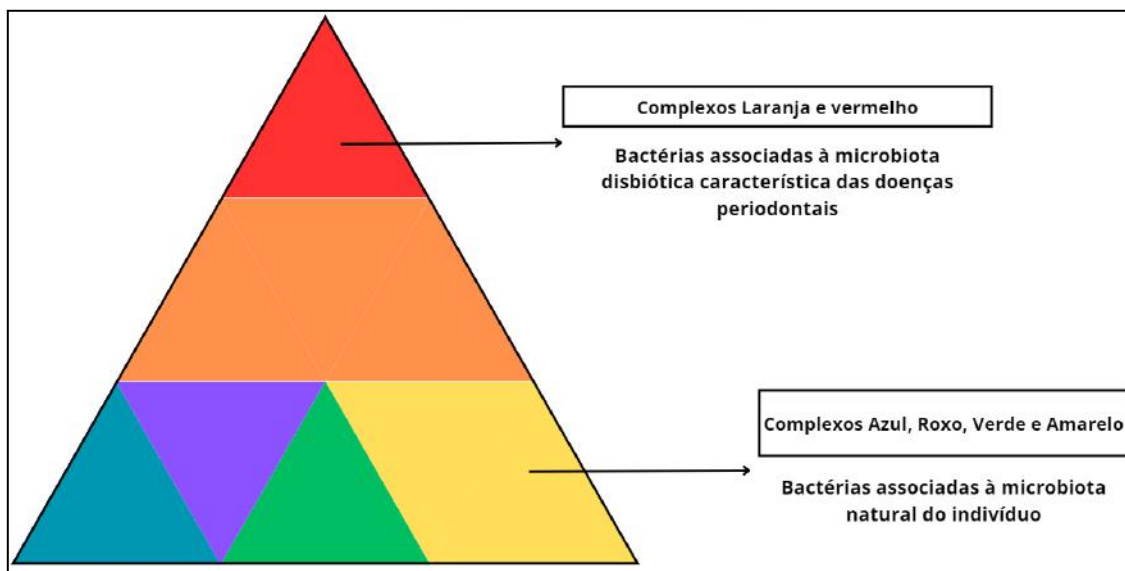
**Figura 1.** Esquema que representa o estado clínico durante condições de Saúde, Gengivite e Periodontite. A presença do biofilme é mais acentuada na Periodontite, bem como a ocorrência da reabsorção óssea e inflamação exacerbada associadas à bolsa periodontal).

## 1.5 Patógenos Periodontais

O conhecimento da etiopatogenia das DP é necessário para o correto diagnóstico e, consequentemente, tratamento dessas condições. Mais de 700 espécies foram identificadas na cavidade oral, sendo que 400 dessas espécies estão presentes na lesão periodontal, e cerca de 50% ainda não são cultiváveis (Paster *et al.*, 2001, 2006; Paster e Dewhirst, 2009; Dewhirst *et al.*, 2010). Estudos microbiológicos das infecções periodontais têm demonstrado que um subgrupo de microrganismos do biofilme subgingival está associado à etiologia dessas doenças (Socransky e Haffajee, 2005; Socransky *et al.*, 2005).

Nas diversas formas de infecções periodontais, a composição da microbiota subgingival, varia de acordo com a gravidade da doença, assim como entre indivíduos ou entre sítios periodontais num mesmo indivíduo (Socransky e Haffajee, 2005; Socransky *et al.*, 2005). Dentre as principais espécies consideradas como patógenos periodontais destacam-se *F. nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Socransky e Haffajee, 2005; Socransky *et al.*, 2005).

Em 2005, Socransky e colaboradores descreveram que algumas espécies bacterianas orais do biofilme subgingival estavam intimamente relacionadas entre si, agrupavam-se em complexos (Figura 2) e essas associações eram organizadas de forma hierárquica. Esses autores também demonstraram que os complexos apresentavam uma correlação espacial entre si (Socransky *et al.*, 2005). Por exemplo, os complexos azul, roxo, amarelo e verde correspondem aos microrganismos comensais frequentemente encontrados em todos os sítios periodontais e indivíduos, condizentes com a saúde oral. Já os complexos laranja e vermelho compreendem espécies patogênicas, predominante em sítios periodontais e/ou indivíduos portadores de DP (Figura 2) (Socransky e Haffajee, 2002).



**Figura 2.** Esquema representando os complexos microbianos encontrados no biofilme.

Além desses patógenos periodontais já reconhecidos, a identificação de novos microrganismos com potencial patogênico tem ampliado nossa compreensão sobre a complexidade do biofilme periodontal. Muitas dessas espécies incluem reconhecidos patógenos associados a outras infecções em humanos, tais como *Streptococcus pyogenes*, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Colombo *et al.*, 2002, 2009; Souto *et al.*, 2014). Outras são espécies ambientais ou ainda não cultiváveis, ainda sem um papel determinado na patogenia dessas doenças (Colombo *et al.*, 2002, 2009; Souto *et al.*, 2014). Dessa forma, não há um patógeno único responsável pela evolução de um estado de saúde para um quadro de periodontite. O que ocorre é um desequilíbrio na abundância relativa de espécies e/ou comunidades microbianas com papéis distintos (antagônicos ou sinérgicos), capazes de moldar a comunidade microbiana em uma entidade patogênica, causando doenças nos tecidos orais ou mesmo extraorais, em determinados indivíduos (Lamont, Hajishengallis e Koo, 2023).

Certamente, estudos futuros deverão identificar um número significativamente maior de novas espécies no microbioma oral/periodontal em relação ao que se é conhecido no presente. Além disso, relações complexas entre essas espécies ou espécies ainda desconhecidas, bem como entre esse microbioma e o hospedeiro poderão ser melhor elucidadas com a finalidade de proporcionar um melhor diagnóstico e tratamento das infecções periodontais (Kolembrandt *et al.*, 2006, 2010).

## 1.6 *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra* como possíveis hospedeiros

*F. nucleatum* é uma bactéria fastidiosa, anaeróbica e gram negativa, sendo uma das espécies mais abundantes na cavidade oral. Atualmente, *F. nucleatum* é considerada uma bactéria oportunista, de tal forma que em indivíduos saudáveis ela assume um papel comensal, mas em determinadas situações (como em uma disbiose) pode vir a assumir um papel de patógeno, levando a uma resposta inflamatória local (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021). Apesar de naturalmente encontrado na microbiota oral, *F. nucleatum* também pode ser encontrado em outros sítios do corpo, como no trato gastrointestinal e placenta, geralmente em condições atípicas compatíveis com processos infecciosos e outras doenças (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021).

Na cavidade oral, *F. nucleatum* tem um papel-chave no desenvolvimento de um biofilme disbiótico que pode levar às DPs. Nesses ambientes inflamatórios, sua carga bacteriana aumenta proporcionalmente à gravidade da doença e ao progresso/extensão da inflamação, caracterizados pela formação da bolsa periodontal, presença de sangramento e/ou supuração (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021). Além dessa situação, a carga bacteriana de *F. nucleatum* também pode aumentar em decorrência de outros fatores do indivíduo, como o tabagismo, obesidade e diabetes do tipo 2 descontrolada (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021).

*F. nucleatum* é uma bactéria com grande capacidade de adesão e coagregação, sendo capaz de se ligar a diferentes células do hospedeiro, além de conseguir coagregar com inúmeras bactérias, tendo um papel essencial no desenvolvimento do biofilme dental. Sua forma alongada e seu enorme arsenal de adesinas permitem com que *F. nucleatum* atue como uma ponte para os colonizadores primários e tardios. Tanta importância de sua presença, *F. nucleatum* compõe cerca de 25% de todo o biofilme periodontal (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021). Dentre suas adesinas mais importantes podemos citar a FadA, Fap2, RadD e aid1. Em especial, a FadA é uma adesina que se liga as caderinas (moléculas de junção celular) o que permite a ligação de *F. nucleatum* a uma grande quantidade de células hospedeiras, como células endoteliais e epiteliais (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021). Além da função de adesão, a FadA também pode atuar como uma invasiva, permitindo com que *F. nucleatum*

invada células hospedeiras como monócitos, células epiteliais e endoteliais (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021).

Outro fator de virulência importante que caracteriza *F. nucleatum* como um potencial patógeno é sua enorme capacidade de induzir resposta inflamatória, estimulando a produção de citocinas como IL-6, IL-8 e TNF-alfa (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021). Em condições de saúde oral, a produção de moléculas inflamatórias e outros fatores de virulência de *F. nucleatum* é regulada pelo hospedeiro, que produz moléculas anti-inflamatórias, mantendo a homeostase local. No entanto, em situações de disbiose, a produção de moléculas inflamatórias quebra a homeostase entre o biofilme e o periodonto. É a indução dessa resposta inflamatória descontrolada que leva à destruição dos tecidos periodontais, como cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021). Além das DPs, *F. nucleatum* tem um papel importante no estabelecimento de outras doenças e condições extra-orais, como Alzheimer, alguns tipos de câncer, problemas intestinais e complicações na gestação (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021). Devido ao seu papel essencial no estabelecimento do biofilme periodontal, sua enorme diversidade de adesinas e sua contribuição no desenvolvimento de DPs, *F. nucleatum* pode ser considerado um hospedeiro compatível para cepas de *Saccharibacteria* spp. predominantes no biofilme periodontal disbiótico.

Outra espécie de grande relevância na etiologia das DPs é a *P. micra*, um coco gram positivo, anaeróbico e fastidioso, presente na microbiota oral e intestinal (Shimizu *et al.*, 2022; Bergsten, *et al.*, 2023; Higashi *et al.*, 2023; Conde-Pérez *et al.*, 2024; Löwenmark *et al.*, 2024). Embora considerada uma espécie comensal, mudanças no microambiente oral e no aporte nutricional pelo hospedeiro podem levar à proliferação e mudanças na interação ambiente/hospedeiro desse microrganismo na periodontite grave. Dessa forma, essa bactéria é considerada um patobionte, sendo normalmente isolada de infecções polimicrobianas, incluindo periodontite, infecções odontogênicas e no câncer colorretal (Shimizu *et al.*, 2022; Bergsten, *et al.*, 2023; Higashi *et al.*, 2023; Conde-Pérez *et al.*, 2024; Löwenmark *et al.*, 2024).

Além da capacidade de adesão às células epiteliais do hospedeiro, *P. micra* também consegue coagregar com patobiontes importantes como *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. Essa interação sinérgica favorece o crescimento de *P. micra*, enquanto também melhora a formação de biofilme por parte de *F. nucleatum* e *P. gingivalis*, o qual adquire resistência a estresse oxidativo.

A presença de *P. micra* no biofilme influencia a expressão de fatores de virulência específicos em *P. gingivalis*, como as proteases *gingipains*, que apresentam diversas funções desde melhorar a adesão ao hospedeiro até clivar precursores de enzimas pró-inflamatórias como os de IL-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (Shimizu *et al.*, 2022; Bergsten, *et al.*, 2023; Higashi *et al.*, 2023; Conde-Pérez *et al.*, 2024; Löwenmark *et al.*, 2024). *P. micra* também é capaz de produzir diversos mediadores inflamatórios, sendo um importante exemplo sua própria parede celular, que induz uma resposta inflamatória em macrófagos, levando a secreção das mesmas citocinas pró-inflamatórias citadas anteriormente (Shimizu *et al.*, 2022; Bergsten, *et al.*, 2023; Higashi *et al.*, 2023; Conde-Pérez *et al.*, 2024; Löwenmark *et al.*, 2024). Apesar dessas características favoráveis para a formação do biofilme, e sua presença comum nas lesões associadas às DPs, a interação desse patógeno com cepas de *Saccharibacteria* ainda não foi testada. Logo, é possível que, além dos comensais gram positivos dos gêneros *Actinomyces*, *Arachnia* e *Schaalia*, *P. micra* seja um hospedeiro compatível.

## 2. JUSTIFICATIVA

A periodontite é a sexta doença humana mais comum, afetando cerca de 45 a 50% da população mundial, e desses casos, 11% representam a forma grave (Sanz *et al.* 2020; Kwon, Lamster e Levin, 2021; Herrera *et al.*, 2024). Além disso, a periodontite é um fator de risco para o desenvolvimento e/ou agravamento de outras doenças crônicas inflamatórias, como doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, artrite e doenças intestinais (Sanz *et al.*, 2020; Herrera *et al.*, 2024).

No biofilme associado às DPs, cepas específicas de *Saccharibacteria* sp. podem ser encontradas em quantidades aumentadas, mas pouco se sabe sobre o papel dessas na etiopatogenia da doença (Brinig *et al.*, 2003).

As formas graves da periodontite são de difícil tratamento, e pacientes com recidivas são os principais alvos para o desenvolvimento de terapias mais personalizadas, as quais sejam eficazes na restauração da microbiota oral associada à saúde periodontal (Kwon, Lamster e Levin, 2021). Logo, a compreensão sobre as interações microbianas nesse ecossistema, principalmente entre diversos hospedeiros bacterianos e cepas epibiontes *Saccharibacteria* sp., é fundamental para um diagnóstico acurado e para o desenvolvimento de terapias eficazes específicas.

### **3. OBJETIVO**

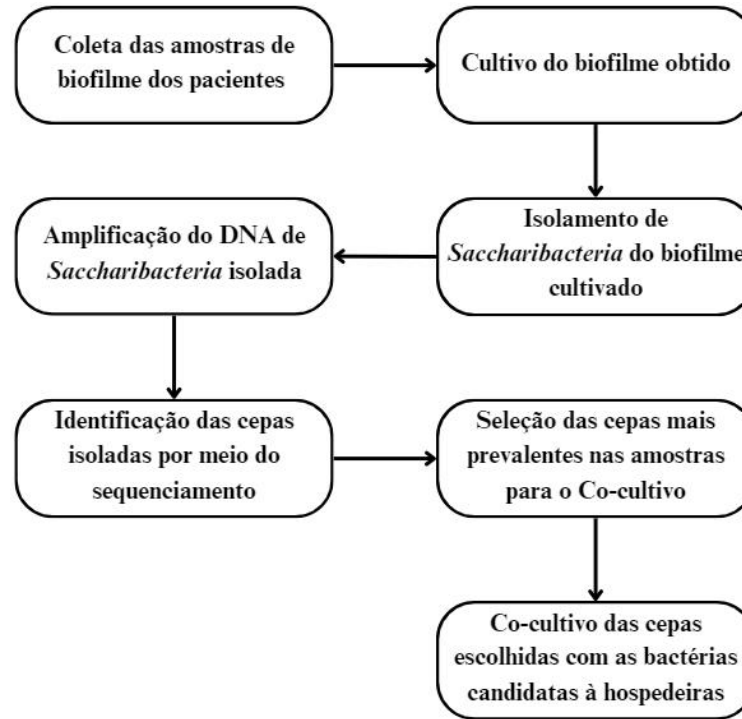
Nosso estudo visa investigar o papel de patógenos periodontais como possíveis hospedeiros para cepas específicas de *Saccharibacteria* isoladas do biofilme subgingival associado às DPs.

#### **3.1 Metas específicas**

Para alcançar esse objetivo, foram determinadas como metas: 1) o isolamento e identificação de cepas *Saccharibacteria* do biofilme subgingival associado à DP; e 2) o co-cultivo dos filotipos mais prevalentes com as bactérias candidatas a hospedeiros.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Fluxograma de Atividades



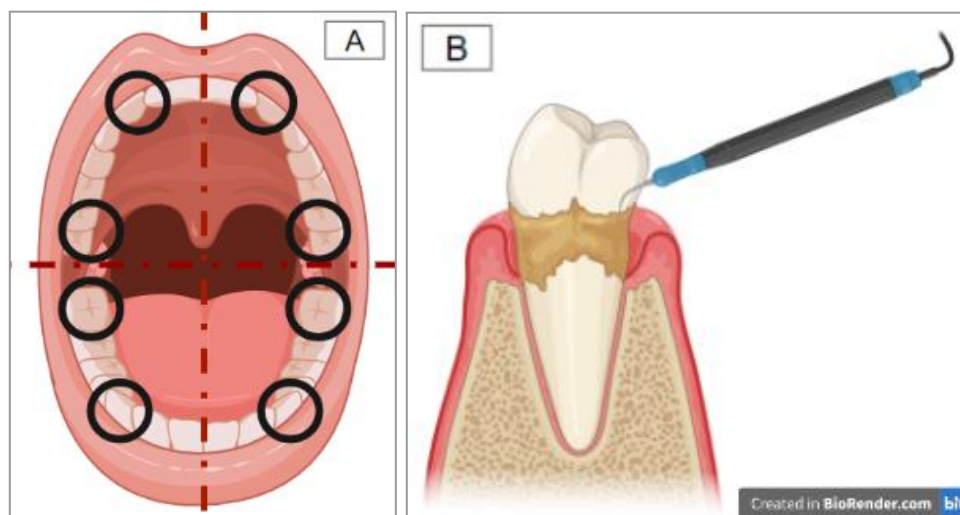
### 4.2 População do Estudo

As amostras de biofilme subgingival utilizadas para o isolamento de cepas de *Saccharibacteria* foram obtidas de pacientes atendidos na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, Brasil. Todos os pacientes tinham pelo menos 18 anos e no mínimo 18 dentes presentes. Os critérios de exclusão foram: realização de tratamento periodontal ou profilaxia até 6 meses antes do exame inicial, terapia antimicrobiana local ou sistêmica nos últimos 6 meses anteriores ao exame clínico inicial, uso de anti-inflamatórios nos últimos 3 meses, diabéticos, imunossuprimidos, grávidas ou lactantes. Todos os pacientes foram esclarecidos quanto aos riscos e benefícios da pesquisa, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (Número do parecer: 5.796.070).

O exame clínico periodontal foi realizado por periodontistas treinados nas instalações da Disciplina de Periodontia do Departamento de Clínica Odontológica da FO-UFRJ e incluíram: anamnese médica e odontológica; medidas de Índice de placa (IP), sangramento gengival/periodontal (SG), profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI). Após o exame, os pacientes foram diagnosticados com saúde periodontal (SP), gengivite (G) e periodontite (P) (Silva-Boghossian *et al.*, 2011 e Caton *et al.*, 2018).

### 4.3 Coleta de Amostras de Biofilme Subgengival para Análise Microbiológica

Após remoção da placa supragengival com gaze estéril, amostras de biofilme subgengival foram obtidas de 2 sítios sadios (1 dente posterior e um dente anterior) por quadrante, totalizando 8 amostras por paciente em indivíduos saudáveis (Figura 3). O mesmo procedimento foi realizado nos pacientes com G (8 amostras de sítios com G) e P (8 amostras das bolsas periodontais com maior profundidade). Essas amostras foram colocadas juntas em tubos criogênicos (8 amostras por tubo/paciente), contendo caldo Micoplasma (Sigma, São Paulo, Brasil) com 5% de DMSO (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil), e imediatamente conduzidas ao Laboratório de Microbiologia Oral para armazenamento à -80 °C (Espíndola *et al.*, 2021). Assim, foi obtida 1 amostra combinada (de 8 sítios periodontais) de biofilme subgengival por paciente.



**Figura 3.** Esquema representando os sítios de coleta do biofilme subgengival

#### 4.4 Cultivo e Isolamento de *Saccharibacteria*

Amostras de biofilme subgingival de um total de 345 pacientes foram obtidas e cultivadas em anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>), em caldo TSBY (triptona de soja e infusão de cérebro e coração, com extrato de levedura), por até uma 1 semana. A presença de *Saccharibacteria* nessas amostras de biofilme foi avaliada através da técnica de PCR, assim como estabelecido por Murugkar e seus colaboradores (Murugkar *et al.*, 2020). Assim, 3 µl da amostra de biofilme crescida em caldo de cultura foram adicionados a uma mistura de reação contendo 12,5 µl de GoTaq MasterMix (Promega, Madison, WI), 0,5 µl de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 7,6 de H<sub>2</sub>O e 10 pmol de cada iniciador específico para uma região alvo do gene 16S rRNA (*rrs*) em *Saccharibacteria* (Tabela 1). O programa utilizado no termociclador (T100, Thermal Cycler, Bio-Rad) compreendeu uma etapa a 95°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, 60°C de anelamento por 30s e extensão de 72°C por 1 min, seguido de uma extensão final por 2 min. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), usando SYBR Safe (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA) para a marcação de DNA, e as bandas foram visualizadas por luz UV em um transiluminador (MiniBis pro, Bio-Imaging System, Neve Yamin, Israel). Com o auxílio de um marcador de peso molecular (ladder de 100 pb; Sinapse Inc), a detecção de *Saccharibacteria* foi confirmada pela presença de uma banda de aproximadamente 600 pb. Foi utilizado como controle positivo para a PCR, DNA da cepa *Saccharibacteria sp.* HMT-955, gentilmente cedida pelo Dr. Floyd Dewhirst.

Parte dos cultivos em caldo das amostras de biofilme positivas para *Saccharibacteria* foi congelada em meio Mycoplasma (Sigma, São Paulo, Brasil) com 5% de DMSO (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil), enquanto que o restante foi utilizado para o isolamento das cepas de *Saccharibacteria*. Após a sonicação da cultura do biofilme em caldo, esta foi filtrada através da passagem por uma membrana de 0,22µm (Sterile Syringe Filter, Microlab Scientific), e o filtrado concentrado através da centrifugação (SORVALL) a 26.081 xg durante 180 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi suspenso em meio criogênico para armazenamento a -80°C. Ao mesmo tempo, uma alíquota de 1 µl foi retirada para confirmação da presença de *Saccharibacteria* após filtração e centrifugação, através da PCR acima descrita.

**Tabela 1.** Sequências dos iniciadores utilizados na amplificação do gene *rrs*, codificador do 16S rRNA bacteriano e de parte do gene específico para o gênero *Saccharibacteria*. (Murugkar *et al.*, 2020)

Genes alvos	Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplicon (pb)
16S rRNA ( <i>rrs</i> )	24F	5'-GAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'	1500 pb
	1492R	3'-GHTACCTTGTTACGACTT-5'	
<i>rrs</i> para o gênero <i>Saccharibacteria</i>	580F	5'-AYTGGGCGTAAAGAGTTGC-3'	600 pb
	1177R	3'-GACCTGACATCATCCCCTCCTTCC-5'	

#### 4.5 Identificação das cepas de *Saccharibacteria* isoladas do biofilme subgingival

Para se obter uma grande quantidade de DNA de qualidade dos filtrados de *Saccharibacteria* selecionados para o sequenciamento, optou-se pela técnica de Nested PCR. Assim, foi feita uma primeira amplificação do gene bacteriano *rrs* (16S rRNA) em sua totalidade (16S total), seguida da amplificação de uma região alvo do gene *rrs* específica para o gênero *Saccharibacteria* (Tabela 1).

Para a primeira amplificação da subunidade do 16S rRNA, utilizou-se 3 µL da amostra filtrada, 4 µL de Blend Master Mix (Hot FirePol), 8,6 µL de água ultrapura (H<sub>2</sub>O) e 7 pmol de cada iniciador (Tabela 1). O programa no termociclador (T100, Thermal Cycler, Bio-Rad) foi configurado da seguinte forma: 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, 54°C de anelamento por 30s e extensão de 72°C por 5 min. Os fragmentos resultantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR Safe (ThermoFisher), e visualizados sob luz UV em um transiluminador (MiniBis Pro, Bio-Imaging System). A presença de bandas de aproximadamente 1500 bp confirmou a amplificação do gene bacteriano *rrs*. Esses amplicons foram empregados na segunda amplificação da região alvo do gene *rrs* para *Saccharibacteria*, descrita acima na seção 4.4. Os produtos de 600 pb resultantes do *Nested*-PCR foram purificados através de kit comercial (QIAquick PCR Purification, QIAGEN), e as concentrações de DNA determinadas por espectrofotometria (Nanodrop Lite, Thermo Scientific). Esses amplicons purificados foram então sequenciados pelo método de Sanger para a identificação das cepas de *Saccharibacteria* predominantes nas amostras clínicas de biofilme subgingival. Aliquotas dos amplicons foram enviadas em duplicata, uma para a fita contínua e

outra para a fita descontínua, juntamente com os iniciadores específicos para *Saccharibacteria* (Tabela 1), à Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA), localizada no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (Centro de Ciências da Saúde, UFRJ).

#### **4.6 Seleção das Cepas Clínicas de *Saccharibacteria* para co-cultivo com hospedeiros**

Os dados brutos referentes ao sequenciamento dos amplicons do gene *rrs* para *Saccharibacteria* foram analisados utilizando do programa Geneious (versão 6.1), de acordo com Loss e Dalapicola (2014). Inicialmente, a fita consenso gerada pelo alinhamento passou por um processo de edição manual para remoção de regiões de baixa qualidade presentes em suas extremidades. A remoção foi realizada até que os nucleotídeos remanescentes apresentassem qualidade adequada nas regiões iniciais e finais. Após essa etapa de curadoria manual, a fita consenso foi importada no programa BioEdit 7.2 para a edição manual de regiões internas. Nas posições onde não foi possível identificar o nucleotídeo com segurança, retornou-se ao Geneious para uma análise mais detalhada das fitas utilizadas no alinhamento. Caso o nucleotídeo pudesse ser identificado com qualidade relativa, ele era corrigido na sequência; caso contrário, em regiões onde predominavam nucleotídeos de baixa qualidade, o nucleotídeo não identificado era deletado. Quando ambas as fitas apresentavam um nucleotídeo não identificado por entre bases de relativa qualidade, esse nucleotídeo era mantido. As fitas de consenso, devidamente editadas, foram então submetidas a uma pesquisa BLAST com as sequências do banco de dados The Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD/HOMD 3.1). Os filotipos detectados em cada amostra com percentual de identidade > 90% foram anotados.

#### **4.7 Co-cultivo de *Saccharibacteria* sp. com Potenciais hospedeiros bacterianos orais**

Para padronizar o co-cultivo de *Saccharibacteria* com os hospedeiros candidatos, foram realizados diversos experimentos piloto que avaliaram o número de repiques, a pureza dos meios e cultivos, o tempo de permanência de *Saccharibacteria* nas culturas e a viabilidade do hospedeiro. As cepas isoladas e identificadas mais prevalentes foram selecionadas para co-cultivo com os hospedeiros comensais já reconhecidos (*Arachnia* sp. e *Schaalia* sp.), e também com os patógenos periodontais *F. nucleatum* e *P. micra* (Tabela 2).

Como estabelecido por Murugkar e colaboradores, o co-cultivo foi realizado em 2 mL de caldo TSBY, numa proporção de 1:11, onde foram adicionados 200 µl da cepa clínica isolada, e 200 µl do hospedeiro. O co-cultivo foi mantido em anaerobiose a 37°C, por aproximadamente 3-4 dias, quando eram novamente repicados para um novo meio de caldo TSBY, mantendo as proporções de 1:11 (Murugkar *et al.* 2020).

A cada repique, a presença e permanência da cepa de *Saccharibacteria* durante o co-cultivo foi determinada através da reação de PCR descrita acima. A fim de ser considerado um hospedeiro viável, o co-cultivo deveria ser positivo na PCR para *Saccharibacteria* por mais de 4 repiques (Bor *et al.*, 2020).

**Tabela 2.** Cepas utilizadas como potenciais hospedeiros no co-cultivo de *Saccharibacteria* spp.

Bactérias hospedeiras	Cepas	Origem
<i>Arachnia rubra</i>	DSM100122	Sulco gengival de paciente com saúde oral
<i>Arachnia propiônica</i>	F0700	Cavidade bucal
<i>Schaalia</i> sp. (HMT-180)	C29KA	Placa subgengival de bolsa periodontal de paciente com periodontite
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586	Lesão cérvico-facial
<i>Schaalia odontolytica</i>	ATCC 29323	Isolado de dentina cariada profunda
<i>Parvimonas micra</i>	ATCC 33270	Pleurisia purulenta

#### 4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

Com o objetivo de observar a dinâmica de interação e o crescimento de *Saccharibacteria* e seus hospedeiros ao longo do tempo, foi realizada a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do co-cultivo, desde o momento inicial da inoculação de ambas as bactérias no caldo TSBY até 96 horas de incubação em anaerobiose, como previamente descrito. Para esse experimento piloto, foram utilizados a cepa *Saccharibacteria* sp. HMT-955 e o patógeno *F. nucleatum*.

Dessa forma, foram iniciados dois cultivos, um contendo apenas o *F. nucleatum* e outro contendo a co-cultura *F. nucleatum* + HMT-955. Como descrito na seção 4.6, foram adicionados 500µl da cepa HMT-955 e 500µl de *F. nucleatum* em 5 ml de caldo TSBY. Em outro tubo, foi adicionado apenas o hospedeiro, na mesma proporção. A cada 3 dias, uma alíquota de 500µl da

co-cultura era transferida para caldo TSBY fresco. A cada passagem, a presença de *Saccharibacteria* era confirmada pelo PCR, enquanto a viabilidade do hospedeiro e a pureza da co-cultura eram avaliadas por plaqueamento em ágar sangue (FAA com 5% de sangue de carneiro). Todas as culturas foram incubadas em condições de anaerobiose a 37°C. As passagens foram realizadas até que a co-cultura apresentasse resultado negativo para *Saccharibacteria*.

Para a visualização no MEV, a turbidez de uma suspensão de *F. nucleatum* em solução salina foi ajustada para uma densidade óptica de 0.9 a 600 nm. Uma alíquota de 500 µl dessa suspensão foi adicionada em 5 ml de caldo TSBY com e sem 500 µl da cepa HMT-955. Alíquotas foram retiradas do co-cultivo *F. nucleatum*+HMT-955 e do cultivo do hospedeiro *F. nucleatum* nos tempos 0 (T0, imediatamente após a inoculação no caldo), 2 horas após o início do cultivo (T1), 4 horas (T2), 24 horas (T3), 48 horas (T4), 72 horas (T5) e 96 horas (T6). Essas alíquotas foram então centrifugadas a 8.050 xg durante 3 minutos (SORVALL *Fresco*, Thermo Fisher Scientific Inc.). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi dissolvido em tampão PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato, pH 8.0). Esse procedimento foi repetido mais uma vez, e ao final o sedimento foi dissolvido em solução de fixação, composta de Glutaraldeído a 25%, Tampão de Cacodilato de Sódio 0,2M e Água Mili-Q. Após a etapa de fixação, as amostras foram desidratadas em várias concentrações de etanol por 10 min cada, sendo que na última (etanol a 100%) esse processo foi repetido 3 vezes. As alíquotas desidratadas foram secas com o auxílio de um aparelho de ponto crítico, utilizando gás carbônico. A etapa final de metalização das amostras foi realizada no aparelho Leica EM SCD 050 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), durante 70s, empregando uma corrente de 40mA. Todas essas etapas de preparação das amostras para a MEV foram realizadas na Unidade de Microscopia Multiusuário Padrón Lins (Unimicro). Após a metalização, as amostras foram armazenadas a vácuo para posterior análise no microscópio de alta resolução (ZEISS, EVO MA10) do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem da UFRJ (CENABIO).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação dos Isolados Clínicos de *Saccharibacteria* sp.

De um total de 345 amostras de biofilme subgengival, 77 amostras (22,4%) positivas para *Saccharibacteria*, sendo a maioria proveniente de pacientes com DPs (Tabela 3). Destas, 54 foram selecionadas para o sequenciamento por apresentarem amplicons com quantidade e qualidade adequadas de DNA. Três amostras eram de pacientes com SP, 9 com G e 42 com P. Após o BLAST das sequências dos amplicons com o banco de dados do HOMD, observamos majoritariamente a presença das cepas HMT-869 (91%) e HMT-346 (91%), seguida da cepa HMT-349 (80%). As cepas HMT952, HMT-957, HMT-955, HMT-352, HMT-488 foram identificadas em <20% das 54 amostras (Figura 3). Vale ressaltar que as sequências das cepas predominantes HMT-869, HMT-346 e HMT-349 foram simultaneamente detectadas em uma mesma amostra. Por outro lado, os filotipos HMT-952 e HMT-957 foram detectados simultaneamente nas mesmas amostras, nas quais não foram detectadas as três cepas predominantes já citadas (Tabela 3). É possível que diferentes filotipos de *Saccharibacteria* tenham sido isolados de uma mesma amostra de biofilme subgengival durante o processo de filtração, visto que o percentual de identidade (>99%) foi bastante alto, como observado para a amostra do paciente 982. Por outro lado, deve-se considerar que as sequências do amplicon para o gene *rrs* de *Saccharibacteria* dessas amostras tenham alto grau de identidade com mais de um filotipo.

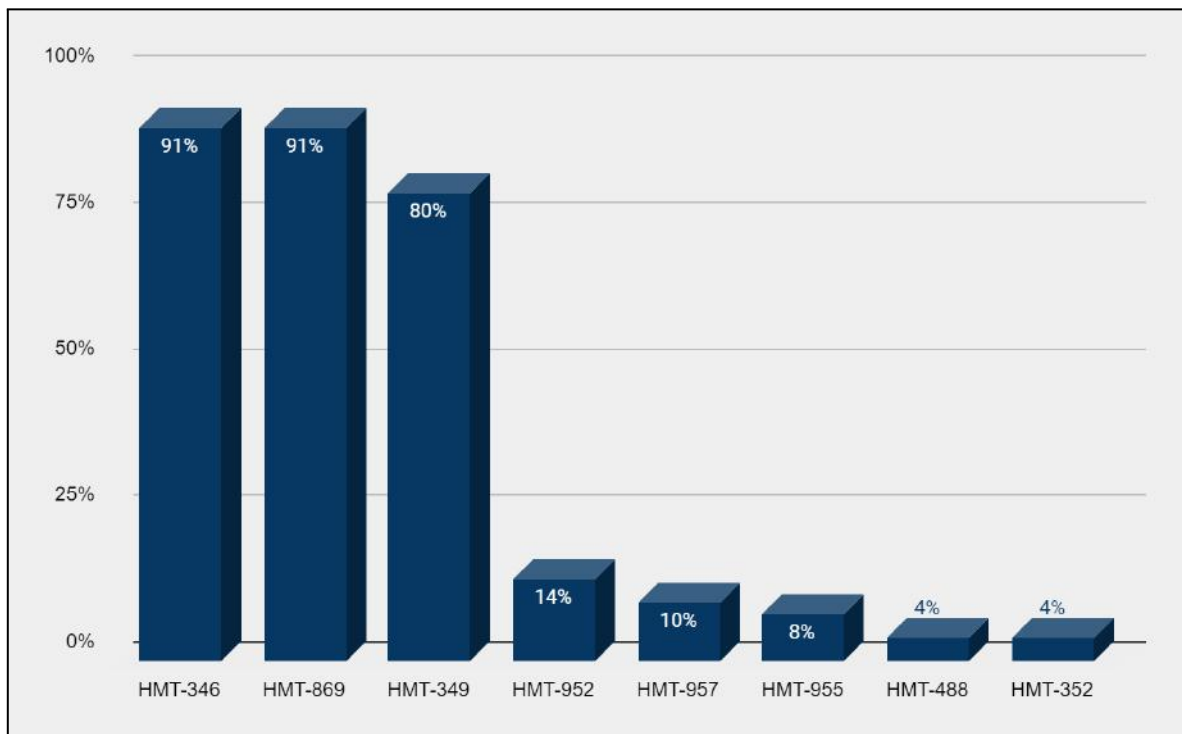
**Tabela 3:** Taxonomia dos principais filotipos de *Saccharibacteria* identificados nos amplicons do gene *rrs* obtidos das cepas clínicas isoladas de amostras de biofilme subgengival. Em verde então as cepas identificadas nas amostras, bem como o percentual de identidade das sequências encontradas. Só foram considerados os filotipos detectados com > 92% de identidade. S = Saúde; P = Periodontite; G = Gengivite.

Grupo clínico	Código da amostra de biofilme subgengival cultivada do paciente	Tamanho da fita consenso (pb)	HMT-346 (%)	HMT-869 (%)	HMT-349 (%)	HMT-952 (%)	HMT-955 (%)	HMT-957 (%)	HMT-488 (%)	HMT-352 (%)
S	247	527	94,70	94,30		93,90				
S	425	533	99,40	98,70	97					
S	686	480	100	99,40	98,30					

G	699	555	99,80	99,10	96,90					
G	715	493				94,70		95,10		94,90
G	747	453	96,60	96,80	96,80					
G	788	460				99,30		99,30		100
G	806	476	97,70	97,50	96,90					
G	810	389	98,20	98,20	97,70					
G	844	502	99,80	99	98					
G	928	465	99,10	99,40	99,40					
G	961	397	95,60	95,90	95,40					
P	661	490	97,40	97			97,40			
P	675	478	94,40	94,40						
P	676	512	100	99,40	97,60					
P	681	458	93,20	92,80	92,10					
P	683	491	98,60	98,20	98,20					
P	684	397				95,40		95,40	95,10	
P	710	460	99,60	99,30	98,90					
P	720	574	100	99,30	97					
P	723	467	97,40	97,20			97,40			
P	726	469	99,30	99,10	98,90					
P	735	445	93,70	93,50		93,10				
P	736	446	93,10		93,10		93,30			
P	743	398	94,50	95	94,50					
P	755	499	100	99,20	98,20					
P	786	461	98,9	98,70	98,90					
P	791	494	100%	99,40	98,20					
P	819	464	100	99,40	99,10					
P	853	430	98,80	98,40	97,90					
P	857	510	100	99,20	98,20					

P	869	440	96,10	96,40	95,90					
P	875	434		95,20		95,0		95,0		
P	908	388	96,80	96,60	95,50					
P	933	472	94,70	94,50			96			
P	944	452	99,60	99,60	99,10					
P	945	454	97,20	97	96,80					
P	946	459	96,50	96,80	97					
P	947	481	98,40	98	97,50					
P	951	448	96,10	96,30	96,70					
P	954	415	95,20	95,20	94,70					
P	957	459	99,10	99,10	98,90					
P	960	448	95,70	95,50	95,30					
P	963	522	93,10	92,90	92,5					
P	966	502	93,80	93,80	95,4					
P	969	392				94,20		94,20	94	
P	972	479	98,60	98,40	98,10					
P	979	368	98,60	98,40	98,10					
P	981	438	98,40	98,60	98,04					
P	982	434	100	99,50	99,10					
P	983	450	98,20	98,50	98,70					
P	985	534	98	97,60	97,60					
P	994	490	98,40	98	97,60					
P	996	460	99,10	99,10	98,90					
P	671	má qualidade do DNA ou sequenciamento								
P	677	má qualidade do DNA ou sequenciamento								
P	678	má qualidade do DNA ou sequenciamento								
P	702	má qualidade do DNA ou sequenciamento								
P	703	má qualidade do DNA ou sequenciamento								
G	707	má qualidade do DNA ou sequenciamento								
P	709	má qualidade do DNA ou sequenciamento								

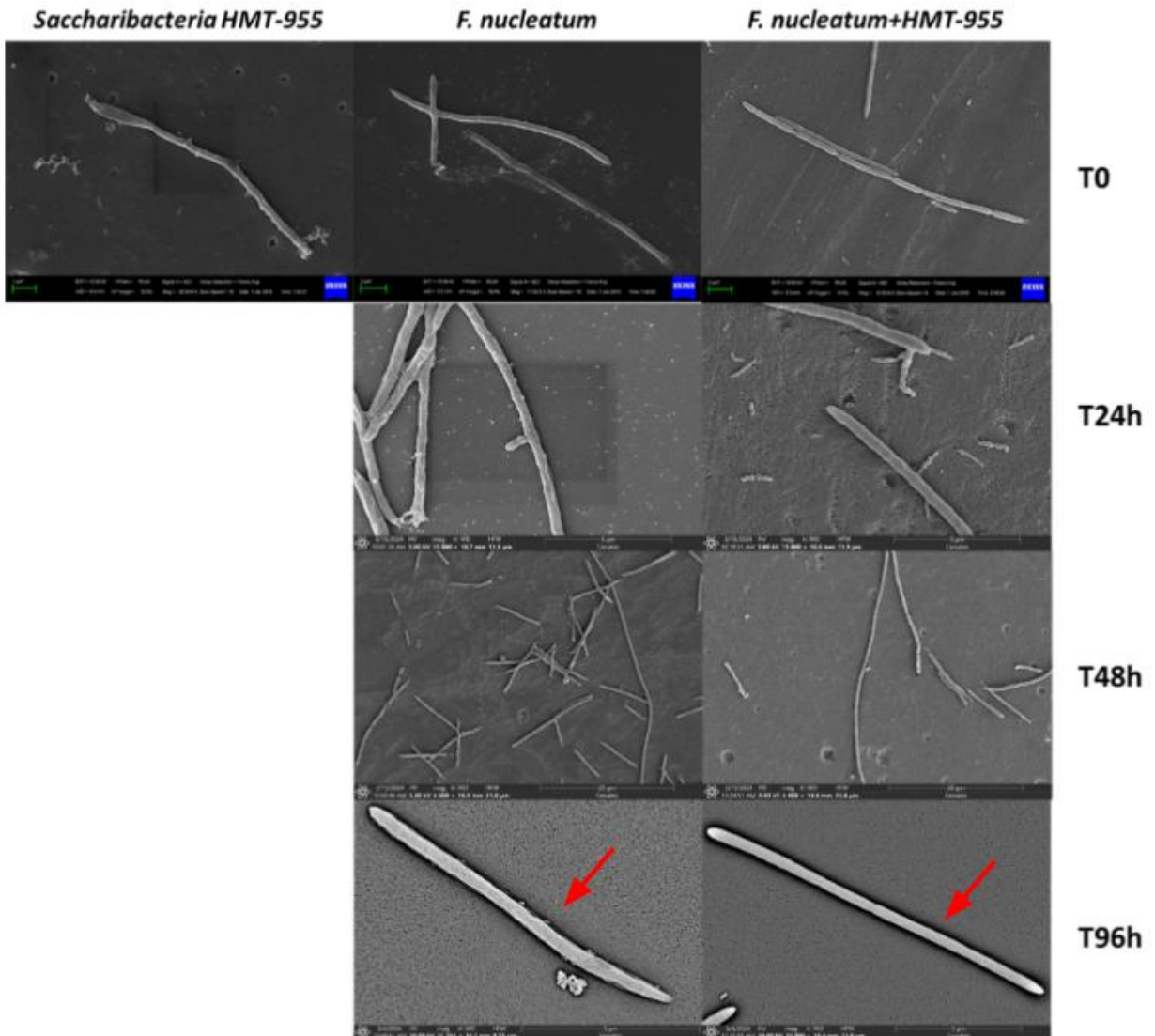
P	846	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	866	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	882	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	884	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	885	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	899	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	934	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	943	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	964	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	995	má qualidade do DNA ou sequenciamento
P	998	má qualidade do DNA ou sequenciamento



**Figura 3.** Distribuição da frequência relativa (%) dos filotipos de *Saccharibacteria* identificados nas 54 amostras clínicas obtidas do cultivo do biofilme subgingival de pacientes com diferentes condições clínicas periodontais.

## 5.2 Co-cultivo de *Saccharibacteria* sp. e Candidatos a Hospedeiros

No experimento piloto de co-cultivo de *F. nucleatum* e a cepa de *Saccharibacteria* sp. HMT-955, esse hospedeiro não foi capaz de manter o crescimento de *Saccharibacteria* sp. por mais de 4 passagens. Esses achados foram confirmados nas imagens obtidas pelo MEV. Comparando *F. nucleatum* sozinho com o co-cultivo, não conseguimos observar diferenças na morfologia de *F. nucleatum* em nenhum dos tempos de co-cultura (Figura 4).



**Figura 4:** Microscopia Eletrônica de Varredura demonstrando imagens do cultivo puro de *Fusobacterium nucleatum* e do co-cultivo dessa bactéria com *Saccharibacteria* sp. HMT-955, nos diferentes tempos de incubação (0, 24h, 48h e 96h de co-cultivo). Na imagem à direita, não observamos a adesão de células de HMT-955 à superfície celular de *F. nucleatum*. A foto à esquerda no alto mostra o inóculo puro de *Saccharibacteria* sp. HMT-955 utilizado nos cultivos com o hospedeiro *F. nucleatum*.

Visto que a cepa controle HMT-955 testada é sabidamente um epibionte de bactérias comensais, as cepas predominantes nas amostras aqui testadas (Figura 3), em particular provenientes de pacientes com periodontite, foram selecionadas para co-cultivo com *F. nucleatum*, *A. propionica*, *S. odontolytica*, *Schaalia* sp. HMT-180 e *P. micra*. Onze cepas clínicas isoladas de pacientes com periodontite, que foram positivas para os filotipos HMT-346, HMT-869 e HMT-349, foram selecionadas para o co-cultivo com as bactérias a serem testadas como hospedeiras. Nenhuma das bactérias testadas foi capaz de sustentar o crescimento dessas cepas de *Saccharibacteria*, como indicado nas reações de PCR realizadas durante as 4 passagens (repiques). Durante as passagens, a viabilidade dos hospedeiros e a pureza das co-culturas foram confirmadas por meio do plaqueamento das co-culturas em caldo TSBY em meio ágar sangue.

**Tabela 4.** Co-cultivo de isolados clínicos contendo as cepas HMT-346, HMT-869 e HMT-349 de *Saccharibacteria* com diferentes espécies orais avaliadas como potenciais hospedeiros. Nenhuma das bactérias testadas conseguiu manter a presença desses filotipos de *Saccharibacteria* por mais de 4 passagens (células em vermelho). As células cinzas correspondem a co-cultivos não testados.

Amostras de biofilme subgingival cultivadas de pacientes	<i>Arachnia propionica</i> (F0231)	<i>Arachnia propionica</i> (F0700)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (ATCC25586)	<i>Parvimonas micra</i> (ATCC33270)	<i>Schaalia</i> sp. (HMT-180)	<i>Schaalia odontolytica</i> (ATCC29323)
710				neg		
819	neg				neg	
908	neg					neg
947			neg			
960		neg				
961			neg			
979				neg		
982	neg				neg	
985	neg					neg
994				neg		
996			neg			

## 6. DISCUSSÃO

A presença de *Saccharibacteria* sp. no biofilme disbiótico associado às doenças periodontais segue sendo evidenciada, e seu papel ainda precisa ser elucidado. Na literatura, os grupos G1 (composto por cepas como HMT-349, HMT-346 e HMT-869) e G5 (HMT-356) (eHOMD) são frequentemente observados nos biofilmes associados à gengivite e à periodontite (Liu *et al.*, 2012; Abusleme *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2019; Papapanou *et al.*, 2020; Chipashvili *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2023 e 2024). Em nossa análise, a presença de HMT-349 e HMT-346 também foi relatada de forma expressiva nas amostras, enquanto que a cepa HMT-356 não foi detectada em nenhuma amostra. Apesar de ter sido detectada em alta frequência (80%) nessas amostras, a cepa HMT-869 não é comumente reportada na literatura como de alta prevalência em condições de periodontite.

É inegável a importância de bactérias hospedeiras para o ciclo da vida de *Saccharibacteria* spp., e descobrir quais são essas bactérias é um passo importante para entender o papel desse gênero bacteriano no biofilme periodontal, seja ele disbiótico ou associado à saúde. Nesse estudo, nosso objetivo foi testar patógenos periodontais, um gram-negativo e outro gram-positivo, como potenciais hospedeiros de cepas de *Saccharibacteria* predominantes na periodontite. Também fizemos o co-cultivo dos filotipos isolados de periodontite com bactérias que naturalmente atuam como hospedeiras para esses epibiontes, como *Arachnia* sp. e *Schaalia* sp. (Bor *et al.*, 2018; Utter *et al.*, 2020). Nossos resultados mostraram que essas bactérias hospedeiras não mantiveram o crescimento das cepas clínicas aqui isoladas, nas condições de cultivo empregadas. Deve-se ressaltar, no entanto, que *Arachnia* sp. e *Schaalia* sp. são excelentes hospedeiros para cepas de *Saccharibacteria* normalmente associadas a outros nichos orais e/ou a condições de saúde periodontal, como os filotipos HMT-955 e HMT-952 (Bor *et al.*, 2018; Utter *et al.*, 2020).

Da mesma forma, *F. nucleatum* também não foi capaz de atuar como um hospedeiro eficiente para *Saccharibacteria* spp., apesar do seu enorme arsenal de proteínas de membrana que permitem a ligação de uma gama de bactérias diferentes (Han, 2015; Brennan e Garrett, 2019; MciLvanna, 2021). Observando os hospedeiros conhecidos de *Saccharibacteria* spp., todos são bactérias gram-positivas, cuja parede celular é composta majoritariamente de peptidoglicana (Brooks *et al.*, 2014). Nesse caso, suspeitamos que a inabilidade de *F. nucleatum* atuar como

hospedeiro poderia ter relação com características da parede celular, ou seja, a presença da membrana externa de lipopolissacarídeo de gram-negativos. A natureza lipídica dessa membrana, junto da presença de enzimas fosfolipases e proteases (Brooks *et al.*, 2014) podem ser fatores que dificultam a ligação de *Saccharibacteria* a bactérias gram-negativas. Para confirmar essa teoria, o patógeno periodontal gram-positivo *P. micra* também foi testado como possível hospedeiro. Assim como *F. nucleatum*, *P. micra* não sustentou o crescimento de *Saccharibacteria*, sugerindo que a interação de *Saccharibacteria* sp. com seus hospedeiros possa envolver outros mecanismos que não dependem somente da parede celular desses hospedeiros.

No experimento piloto, também observamos que *F. nucleatum* não manteve o crescimento da cepa *Saccharibacteria* sp. HMT-955. No entanto, essa cepa não é predominante em lesões com periodontite, apesar de ser detectada no biofilme sub e supragengival (eHOMD; Liu *et al.*, 2012; Abusleme *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2019; Papapanou *et al.*, 2020; Chipashvili *et al.*, 2021). Logo, pode estar mais adaptada aos hospedeiros comensais previamente citados. Na análise por MEV, não observamos mudanças morfológicas no crescimento de *F. nucleatum* na presença de *Saccharibacteria* sp. (HMT-955). Não observamos nenhuma célula de HMT-955 associada à superfície de *F. nucleatum*, reforçando que *F. nucleatum* não é um hospedeiro permissivo para cepas comensais de *Saccharibacteria* até então estudadas (Bor *et al.*, 2020; Utter *et al.*, 2020.). Pode-se também especular que as cepas clínicas aqui testadas tenham uma relação antagonista ou parasitária com os dois patógenos periodontais testados numa condição de cultivo binário, sem a presença de outros microrganismos do biofilme dental que podem ser essenciais na manutenção dessa coagregação bacteriana.

Os mecanismos pelos quais *Saccharibacteria* spp. interagem com seus hospedeiros ainda não estão completamente elucidados. Por exemplo, a co-existência de bactérias orais no biofilme subgengival, *in vivo*, altera a expressão de diversas proteínas (Tolker-Nielsen, 2014; Roy *et al.*, 2017), as quais podem ser fatores importantes no sucesso da relação de epibiose entre *Saccharibacteria* spp. e seus hospedeiros nesses ambientes. Logo, é possível que as limitações técnicas de co-cultivo binário empregadas no presente estudo tenham levado a resultados negativos dessas novas interações com patógenos periodontais. Os testes realizados *in vitro* não reproduzem a complexidade do ambiente periodontal, especialmente numa condição de disbiose na qual o processo inflamatório crônico é um fator chave na manutenção de patógenos periodontais. Desvendar e mimetizar as condições ideais que ocorrem *in vivo* é um dos grandes

desafios do culturoma de espécies ainda não cultivadas. Assim, o emprego de novos meios de cultivo, em diferentes atmosferas, utilizando mais de uma cepa hospedeira ou fatores de crescimento produzidos por algumas bactérias orais são algumas das estratégias que podem ser usadas para avaliar as diferentes interações entre cepas clínicas de *Saccharibacteria* obtidas de diferentes nichos orais com outros hospedeiros patobiontes e comensais. Visto que o biofilme subgingival pode compreender uma comunidade de mais de 400 espécies (Paster *et al.*, 2001), pode-se considerar que uma grande variedade de espécies orais ainda não exploradas possam exercer a função de hospedeiros eficientes para esses epibiontes.

Logo, etapas futuras deste estudo deverão incluir a avaliação das outras cepas clínicas isoladas em condições de cultivo variadas, tanto com novos candidatos a hospedeiro, quanto com as bactérias inicialmente propostas. Além disso, o sequenciamento completo do genoma dos filotipos predominantes (HMT-346, HMT-869 e HMT-349) será realizado para nos auxiliar quanto às vias metabólicas ausentes e presentes nesses epibiontes, as quais possam ser compensadas por hospedeiros específicos. Por fim, experimentos *in vivo* ou que mimetizem a presença de um biofilme dental necessitam ser realizados, visando o melhor entendimento sobre a interação entre *Saccharibacteria* spp. e seus diferentes hospedeiros, e o papel desses consórcios na ecologia oral.

## 7. CONCLUSÃO

Os filotipos *Saccharibacteria* sp. HMT-346, HMT-869 e HMT-349 compreenderam os filotipos isolados mais prevalentes no biofilme subgengival de pacientes com doença periodontal. Entretanto, os patógenos periodontais *F. nucleatum* e *P. micra*, e as bactérias orais comensais *Arachnia propionica* e *Schaalia* spp. não foram capazes de manter o crescimento desses epibiontes nas condições de cultivo *in vitro* empregadas no presente estudo. Ainda assim, a possibilidade dessas espécies bacterianas atuarem como hospedeiras eficientes para esses filotipos de *Saccharibacteria* em outras condições de cultivo não deve ser descartada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abusleme, L., Dupuy, A.K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J.A., Strausbaugh, L.D., Gamonal, J. e Diaz, P.I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. PubMed Central, 23303375.
- Bergsten, E., Mestivier, D., Donnadieu, F., Pedron, T., Barau, C., Meda, L.T., Mettouchi, A., Lemichez, E., Gorgette, O., Chamaillard, M., Vaysse, A., Volant, S., Doukani, A., Sansonetti, P.J., Sobhani, I. e Nigro, G. (2023). *Parvimonas micra*, an oral pathobiont associated with colorectal cancer, epigenetically reprograms human colonocytes. PubMed Central, 37842920.
- Bor, B., Poweleit, N., Bois, J.S., Cen, L., Bedree, J.K., Zhou, Z.H., Gunsalus, R.P., Lux, R., McLean, J.S., He, X. e Shi, W. (2017). Phenotypic and physiological characterization of the epibiotic interaction between TM7x and its basibiont *Actinomyces*. PubMed Central, 26597961.
- Bor, B., McLean, J.S., Foster, K.R., Cen, L., To, T.T., Serrato-Guillen, A., Dewhirst, F.E., Shie, W. e He, X. (2018). Rapid evolution of decreased host susceptibility drives a stable relationship between ultrasmall parasite TM7x and its bacterial host. PubMed Central, 30442671
- Bor, B., Bedree, J.K., Shi, W., McLean J.S. e He, X. (2019). Saccharibacteria (TM7) in the human oral microbiome. PubMed Central, 30894042.
- Bor, B., Collins, A.J., Murugkar, P.P., Balasubramanian, S., To, T.T., Hendrickson, E.L., Bedree, J.K., Bidlack, F.B., Johnston, C.D., Shi, W., McLean, J.S., He, X. e Dewhirst, F.E. (2020). Insights obtained by culturing Saccharibacteria with their bacterial hosts. PubMed Central, 32075512.
- Brennan, C.A. e Garrett, W.S. (2019). *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. PubMed Central, 30546113.
- Brinig, M.M., Lepp, P.W., Ouverney, C.C., Armitage, G.C. e Relman, D.A. (2003). Prevalence of bacteria of division TM7 in human subgingival plaque and their association with disease. PubMed Central, 12620860.
- Brooks, G.F. (2014). Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. e Mietzner, T.A., eds. 26 (Nova Iorque, McGraw Hill Education), pp. 23-30.
- Caton, J.G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I.L.C., Jepsen, S., Kornman, K.S., Mealey, B.L., Papapanou, P.N., Sanz, M. e Tonetti, M.S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. PubMed Central, 29926489.
- Chipashvili, O., Utter, D.R., Bedree, J.K., Ma, Y., Schulte, F., Mascarini, G., Alayyoubi, Y., Chouhan, D., Hardt, M., Bidlack, F., Hasturk, H., He, X., Mclean, J.S. e Bor, B. (2021). Episymbiotic *Saccharibacteria* suppresses gingival inflammation and bone loss in mice through host bacterial modulation. PubMed Central, 34637779.
- Colombo, A.P.V., Teles, R.P., Torres, M.C., Souto, R., Rosalém, W.J., Mendes, M.C. e Uzeda, M. (2002). Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. PubMed Central, 11990436.

Colombo, A.P.V., Boches, S.K., Cotton, S.L., Goodson, J.M., Kent, R., Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Hasturk, H., Dyke, T.E.D., Dewhirst, F. e Paster, B.J. (2009). Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification array. PubMed Central, 19722792.

Conde-Pérez, K., Buetas, E., Aja-Macaya, P., Arribas, E.M., Iglesias-Corrás, I., Trigo-Tasende, N., Nasser-Ali, M., Estévez, L.S., Rumbo-Feal, S., Otero-Alén, B., Noguera, J.F., Concha, A., Pardiñas-López, S., Carda-Diéguez, M., Gómez-Randulfe, I., Martínez-Lago, N., Ladra, S., Aparicio, L.A., Bou, G., Mira, A., Vallejo, J.A. e Poza, M. (2024). *Parvimonas micra* can translocate from the subgingival sulcus of the human oral cavity to colorectal adenocarcinoma. PubMed Central, 37558206.

Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C.R., Yu, W., Lakshmanan, A. e Wade, W.G. (2010). The human oral microbiome. PubMed Central, 20656903.

Dewhirst, F.E., Klein, E.A., Thompson, E.C., Blanton, J.M., Chen, T., Mirella, L., Buckley, C.M.F., Davis, I.J., Bennet, M. e Marshall-Jones, Z.V. (2012). The canine oral microbiome. PLOS ONE 7(4): e36067.

Dudek, N.K., Sun, C.L., Burstein, D., Kantor, R.S., Goltsman, D.S.A., Bik, E.M., Thomas, B.C., Banfield, J.F. e Relman, D.A. (2017). Novel microbial diversity and functional potential in the marine mammal oral microbiome. Current Biology 27, 3752-3762.

eHOMD (2008). Expanded Human Oral Microbiome Database V3.1. Disponível em: <https://www.homd.org>. Acesso em 23/11/2024.

Espindola, L.C.P., Nascimento, M.V.M.R., Souto, R.M. e Colombo, A.P.V. (2021) Antimicrobial susceptibility and virulence of *Enterococcus* spp. isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm.

Geneious Prime 2024. 6.1 (<https://www.geneious.com/>)

Han, Y.W. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. PubMed Central, 25576662.

He, X., McLean, J.S., Edlund, A., Yooseph, S., Hall, A.P., Liu, S., Dorrestein, P.C., Esquenazi, E., Hunter, R.C., Cheng, G., Nelson, K.E., Lux, R. e Shi, W. (2015). Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. PubMed Central, 25535390.

Herrera, D., Sanz, M., Shapira, L., Brotons, C., Chapple, I., Frese, T., Graziani, F., Hobbs, F.D.R., Huck, O., Hummers, E., Jepsen, S., Kravtchenko, O., Madianos, P., Molina, A., Urgan, M., Vilaseca, J., Windak, A. e Vinker, S. (2024). Periodontal diseases and cardiovascular diseases, diabetes, and respiratory diseases: summary of the consensus report by the European Federation of Periodontology and WONCA Europe. PubMed Central, 38511739.

Higashi, D.L., Krieger, M.C., Qin, H., Zou, Z., Palmer, E.A., Kreth, J. e Merritt, J. (2023). Who is in the driver's seat? *Parvimonas micra*: An understudied pathobiont at the crossroads of dysbiotic disease and cancer. PubMed Central, 36999244.

- Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Webb, R.I., Wagner, A.M. e Blackall, L.L. (2001). Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain *bacteria* with no known pure-culture representatives. PubMed Central, 11133473.
- Escapa, I.F., Chen, T., Huang, Y., Gajare, P., Dewhirst, F.E. e Lemon, K.P. (2018). New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. PubMed Central, 30534599.
- Ji, Y., Zhang, P., Zhou, S., Gao, P., Wang, B. e Jiang, J. (2022). Widespread but poorly understood bacteria: candidate phyla radiation. PubMed Central, 36422302.
- Kadouri, D., Venzon, N.C. e O'Toole, G.A. (2006). Vulnerability of pathogenic biofilms to *Micavibrio aeruginosavorus*. PubMed Central, 17098913.
- Kolenbrander, P.E., Palmer Jr, R.J., Rickard, A.H., Jakubovics, N.S., Chalmers, N.I. e Diaz, P.I. (2006). Periodontology 2000 42, 47-79.
- Kolenbrander, P.E., Palmer Jr, R.J., Periasamy, S. e Jakubovics, N.S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. Nature Reviews Microbiology 8, 471-480.
- Kwon, T., Lamster, I.B. e Levin, L. (2021). Current concepts in the management of periodontitis. PubMed Central, 34839889.
- Lamont, R.J., Hajishengalis, G. e Koo, H. (2019). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. PubMed Central, 30301974.
- Lamont, R.J., Hajishengallis, G. e Koo, H. (2023). Social networking at the microbiome-host interface. PubMed Central, 37594277.
- Liu, B., Faller, L.L., Klitgord, N., Mazumdar, V., Ghodsi, M., Sommer, D.D., Gibbons, T.R., Treangen, T.J., Chang, Y., Li, S., Stine, O.C., Hasturk, H., Kasif, S., Segrè, D., Pop, M. e Amar, S. (2012). Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. PubMed Central, 22675498.
- Loss, A.C. e Dallapicola, J. (2014). Tutorial de alinhamento múltiplo do geneious 6.1. Laboratório de Mastozoologia e Biogeografia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. disponível em: <http://blog.ufes.br/lamab/tutoriais>
- Lourenço, T.G.B., Heller, D., Silva-Boghossian, C.M., Cotton, S.L., Paster, B.J. e Colombo, A.P. (2014). Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. PubMed Central, 25139407.
- Löwenmark, T., Köhn, L., Kellgren, T., Rosenbaum, W., Bronnec, V., Löfgren-Burström, A., Zingmark, C., Larsson, P., Dahlberg, M., Schroeder, B.O., Wai, S.N., Ljuslinder I., Edin, S. e Palmqvist, R. (2024). *Parvimonas micra* forms a distinct bacterial network with oral pathobionts in colorectal cancer patients. PubMed Central, 39420333.
- Marcy, Y., Ouverney, C., Bik, E.M., Losekann, T., Ivanova, N., Martin, H.G., Szeto, E., Platt, D., Hugenholtz, P., Relman, D.A. e Quake, S.R. (2007). Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. PubMed Central, 17620602.

McIlvanna, E., Linden, G.J., Craig, S.G., Lundy, F.T. e James, J.A. (2021). *Fusobacterium nucleatum* and oral cancer: a critical review. PubMed Central, 34774023.

McLean, J.S., Bor, B., Kerns, K.A., Liu, Q., To, T.T., Solden, L., Hendrickson, E.L., Wrighton, K., Shi, W. e He, X. (2020). Acquisition and adaptation of ultra-small parasitic reduced genome bacteria to mammalian hosts. PubMed Central, 32698001.

Michaud, D.S., Fu, Z., Shi, J. e Chung, M. (2017). Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk. PubMed Central, 28449041.

Moreira, D., Zivanovic, Y., López-Archilla, A.I., Iniesto, M. e López-García, P. (2021). Reductive evolution and unique predatory mode in the CPR bacterium *Vampirococcus lugosii*. PubMed Central, 33911080.

Murugkar, P.P., Collins, A.J., Chen, T. e Dewhirst, F.E. (2020). Isolation and cultivation of candidate phyla radiation *Saccharibacteria* (TM7) bacteria in coculture with bacterial hosts. PubMed Central, 33209205.

Nakajima, H., Hongoh, Y., Usami, R., Kudo, T. e Ohkuma, M. (2005). Spatial distribution of bacterial phylotypes in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* and the bacterial community colonizing the gut epithelium. FEMS Microbiology Ecology 54, 247-255.

Nie, J., Utter, D.R., Kerns, K.A., Lamont, E.I., Hendrickson, E.L., Liu, J., Wu, T., He, X., McLean, J. e Bor, B. (2022). Strain-level variation and diverse host bacterial responses in episympiotic saccharibacteria. PubMed Central, 35343799.

Papapanou, P.N., Park, H., Cheng, B., Kokaras, A., Paster, B., Burkett, S., Watson, C.W., Annavajhala, M.K., Uhlemann, A. e Noble, J.M. (2020). Subgingival microbiome and clinical periodontal status in an elderly cohort: The WHICAP ancillary study of oral health. PubMed Central, 32533776.

Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A., e Dewhirst, F.E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. PubMed Central, 11371542.

Paster, B.J., Olsen, I., Aas, J.A. e Dewhirst, F.E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontology 2000 42, 80-87.

Paster, B.J. e Dewhirst, F.E. (2009). Molecular microbial diagnosis. Periodontology 2000 51, 38-44.

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G. e Tiwari, V. (2017). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. PubMed Central, 28362216.

Sanz, M., Castillo, A.V., Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J.R., D'Aiuto, F., Bouchard, P., Chapple, I., Dietrich, T., Gotsman, I., Graziani, F., Herrera, D., Loos, B., Madianos, P., Michel, J., Perel, P., Pieske, B., Shapira, L., Shechter, M., Tonetti, M., Vlachopoulos, C. e Wimmer, G. (2020). Periodontitis and cardiovascular diseases: consensus report. PubMed Central, 32011025.

Shimizu, K., Horinishi, Y., Sano, C. e Ohta, R. (2022). Infection route of *Parvimonas micra*: A case report and systematic review. PubMed Central, 36141340.

Silva-Boghossian, C.M., Souto, R.M., Luiz, R.R. e Colombo, A.P. (2011). Association of red complex *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. PubMed Central, 21397893.

Socransky, S.S. e Haffajee, A.D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000 28, 12-55.

Socransky, S.S. e Haffajee, A.D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 38, 135-187.

Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. e Kent Jr., R.L. (2005). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25, 134-144.

Souto, R., Silva-Boghossian, C.M. e Colombo, A.P.V. (2014). Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. PubMed Central, 25242933.

Starr, E.P., Shi, S., Blazewicz, S.J., Probst, A.J., Herman, D.J., Firestone, M.K. e Banfield, J.F. (2018). Stable isotope informed genome-resolved metagenomics reveals that Saccharibacteria utilize microbially-processed plant-derived carbon. PubMed Central, 29970182.

Tolker-Nielsen, T. (2014). Biofilm development. PubMed Central, 26104692.

Utter, D.R., He, X., Cavanaugh, C.M., McLean, J.S. e Bor, B. (2020). The saccharibacterium TM7x elicits differential responses across its host range. PubMed Central, 32839546.

Wei, Y., Shi, M., Zhen, M., Wang, C., Hu, W., Nie, Y. e Wu, X. (2019). Comparison of subgingival and buccal mucosa microbiome in chronic and aggressive periodontitis: a pilot study. PubMed Central, 30915280.

Yang, H., Ma, Y., Xie, X., Wang, H., Li, X., Fang, D. e Bai, Y. (2023). *Candida albicans* enriched in orthodontic derived white spot lesions and shaped focal supragingival bacteriome. PubMed Central, 36760510.

Yang, H., Ma, Y., Gao, H., Xie, X., Wang, H., Li, X. e Bai, Y. (2024). Supragingival microbiome variations and the influence of *Candida albicans* in adolescent orthodontic patients with gingivitis. PubMed Central, 38882240.

**Anexo 1.** Árvore filogenética do filo CPR de acordo com a atual taxonomia provisória. (Escapa *et al.*, 2018; Mclean *et al.*, 2020)

- [-] Phylum Saccharibacteria\_(TM7) [20, 48, 17]
  - [-] Class Saccharibacteria\_(TM7)\_[C-1] [20, 48, 17]
    - [-] Order Saccharibacteria\_(TM7)\_[O-1] [20, 48, 17]
      - [-] Family Saccharibacteria\_(TM7)\_[F-1] [19, 48, 15]
        - [-] Genus Candidatus\_Saccharimonas [0, 0, 0]
          - [-] Species Candidatus\_Saccharimonas aalborgensis [0, 0, 0]
        - [-] Genus Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] [10, 38, 9]
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_346
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_347
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_348
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_349
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_352
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_353
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_488
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_869
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_952
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-1] bacterium\_HMT\_957
        - [-] Genus Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-2] [1, 1, 1]
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-2] bacterium\_HMT\_350
        - [-] Genus Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-3] [4, 4, 1]
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-3] bacterium\_HMT\_351
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-3] bacterium\_HMT\_364
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-3] bacterium\_HMT\_367
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-3] bacterium\_HMT\_371
        - [-] Genus Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-4] [1, 0, 1]
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-4] bacterium\_HMT\_355
        - [-] Genus Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-6] [1, 0, 1]
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-6] bacterium\_HMT\_870
        - [-] Genus Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-7] [1, 0, 1]
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-7] bacterium\_HMT\_954
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-7] bacterium\_HMT\_986
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-7] bacterium\_HMT\_987
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-7] bacterium\_HMT\_989
        - [-] Genus Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-8] [1, 5, 1]
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-8] bacterium\_HMT\_955
      - [-] Family Saccharibacteria\_(TM7)\_[F-2] [1, 0, 2]
        - [-] Genus Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-5] [1, 0, 2]
          - [-] Species Saccharibacteria\_(TM7)\_[G-5] bacterium\_HMT\_356

