

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MÁRCIA VIANA BESSA NOGUEIRA

**DETECÇÃO DE *Porphyromonas gingivalis* E DOS GENÓTIPOS *fimA* II E IV EM
PORTADORES DE PERIODONTITE AGRESSIVA**

FORTALEZA

2011

MÁRCIA VIANA BESSA NOGUEIRA

**DETECÇÃO DE *Porphyromonas gingivalis* E DOS GENÓTIPOS *fimA* II E IV EM
PORTADORES DE PERIODONTITE AGRESSIVA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo

FORTALEZA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

N713d Nogueira, Márcia Viana Bessa
Detecção de *Porphyromonas gingivalis* e dos genótipos *fimA* II e IV em portadores de periodontite agressiva / Márcia Viana Bessa Nogueira. – 2011.
60 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2011.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo

1. Periodontite Agressiva 2. Fatores de Virulência 3. Fórnice I. Título.

CDD 617.632

MÁRCIA VIANA BESSA NOGUEIRA

**DETECCÃO DE *Porphyromonas gingivalis* E DOS GENÓTIPOS *fimA* II E IV EM
PORTADORES DE PERIODONTITE AGRESSIVA**

Dissertação submetida à coordenação do curso de pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, Área de concentração em Clínica Odontológica

Aprovada em ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof.^a Dr.^a Márcia Pinto Alves Mayer
Universidade de São Paulo - USP

Prof.^a Dr.^a Flávia Aparecida Chaves Furlaneto
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico este trabalho

a Deus, pela força para prosseguir e pela concretização de mais um objetivo.

A minha mãe Lúcia, meu alicerce, pela dedicação, incentivo e presença constante.

Ao meu pai Bessa (*in memoriam*), pelo amor e por tudo que representa em minha vida.

A minha avó Virgilina (*in memoriam*), pelos exemplos de paciência e fé.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo, pelas oportunidades, ensinamentos e confiança depositada. Reconheço a sua dedicação, empenho e apoio na realização desta pesquisa.

À professora Dr.^a Márcia Pinto Alves Mayer, pela receptividade, disponibilidade e por ter colaborado com a realização da fase laboratorial (PCR em tempo real). A sua contribuição foi indispensável para a concretização desta pesquisa.

À Silvia Regina Loureiro Teixeira, pela paciência para repassar os conhecimentos da técnica do PCR em tempo real e pela colaboração na conclusão desta pesquisa.

À amiga Virgínia Silveira, pela participação em todos os momentos. A sua contribuição e incentivo foram fundamentais para a conclusão desta pesquisa.

A todos os alunos e funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial Dione, Josy, Talyta, Érica, Pâmela e Liliane, pela forma como fui acolhida.

Ao Gustavo Vieira, pelo companheirismo e pela colaboração na fase laboratorial.

À amiga Kátia Linhares Lima Costa pelo incentivo e presença constante em todas as fases da minha formação.

Ao professor Dr. Joni Augusto Cirelli e aos alunos da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial, Andressa Vilas Boas e Yeon pela receptividade e pelos ensinamentos.

Ao professor Egbert Toledo e sua esposa Lilia pela atenção dispensada comigo e pelo excelente acolhimento em Araraquara.

Aos colegas de mestrado Lívia, Yuska, Jiovanne, Caio e João Paulo por terem compartilhado comigo esta fase tão importante da minha formação.

À colega de mestrado Janaína Rocha que sempre esteve disposta a ajudar.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), em especial ao Dr. Sérgio Lima Santiago pelo incentivo e esforço para aprimorar o curso e a formação do corpo discente.

À professora Dra. Nádia Accioly pela disposição para ajudar e por ter disponibilizado material teórico.

Aos funcionários da secretaria do PPGO, em especial Lúcia Ribeiro e Janaine pelos esclarecimentos e pela colaboração sempre que solicitadas.

Aos professores Ricardo Martins e Mônica Studart, pelos ensinamentos e por estarem sempre dispostos a colaborar.

Ao meu irmão Ricardo Bessa, pelos exemplos de determinação e dedicação à carreira acadêmica.

A todos os parentes e amigos que incentivaram e acreditaram na minha capacidade, em especial Tércio Gouveia, Elisabeth Daher, Inês Nogueira e Kellen Barreira.

À Coordenação de Saúde Bucal da Secretaria Executiva Regional III da Prefeitura Municipal de Fortaleza, em especial Cláudia Freitas e Renata Luzia, por terem compreendido a importância do curso de mestrado na minha formação.

Aos colegas e coordenadoras do Centro de Saúde da Família César Cals de Oiveira Filho da Prefeitura Municipal de Fortaleza, em especial Andréa Oliveira, Adriana Martins, Eulália e Neuma, pelo apoio.

À amiga Ana Flávia de Araújo Lima, pelo incentivo e companheirismo.

A todos os pacientes e participantes desta pesquisa que de uma maneira toda especial foram responsáveis pelo interesse neste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 478161/2007) e à CAPES (Edital Pró-Equipamentos 60-01/2007 e PROCAD NF 2313/2008) pelo suporte financeiro a este estudo.

“O que fizemos apenas por nós mesmos morre conosco; o que fizemos pelos outros e pelo mundo permanece e é imortal.”

(Albert Pike)

RESUMO

Porphyromonas gingivalis é um patógeno extremamente associado com a etiologia da periodontite crônica e agressiva. O objetivo deste estudo foi avaliar através de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time*-PCR) a presença de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) e dos genótipos *fimA* II e IV em indivíduos com periodontite agressiva generalizada (PAG). Quarenta indivíduos com PAG ($29,7 \pm 8,1$ anos) foram analisados clinicamente - Índice de Placa (IP), Índice Gengival (IG), profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínico (NIC) - e microbiologicamente, através de *Real Time* PCR, quanto à presença de *Pg* e dos genótipos *fimA* II e IV. Amostras de biofilme subgengival foram colhidas do sítio proximal com maior PS e maior NIC. Médias de PS e NIC desses sítios foram respectivamente: $9,5 \pm 2,2$ mm e $10,2 \pm 2,8$ mm. *P. gingivalis* foi observado em 26 (65%) dos indivíduos. O genótipo *fimA* II foi verificado em 16 (61,53%) enquanto o genótipo *fimA* IV em 7 (26,92%) dos que apresentaram *P. gingivalis*. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre os parâmetros clínicos dos indivíduos que apresentaram ou não o microrganismo ou seus respectivos genótipos. Também não foi verificada associação entre a presença dos genótipos e idade ou gênero dos pacientes. Os dados sugerem uma associação entre genótipos *fimA* II de *Porphyromonas gingivalis* quando da ocorrência deste microrganismo em indivíduos com periodontite agressiva generalizada.

Palavras-chave: Periodontite Agressiva. Fatores de Virulência. Fímbria.

ABSTRACT

Porphyromonas gingivalis is a pathogen strongly associated with the etiology of chronic and aggressive periodontitis. The purpose of this study was to evaluate by Real-Time polymerase chain reaction (Real Time-PCR) the presence of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *fimA* genotypes type II and type IV in patients with generalized aggressive periodontitis (GAgP). Forty individuals with aggressive periodontitis (AgP) (29.7 ± 8.1 years) were clinically analyzed through plaque index (PI), gingival index (GI), probing depth (PD), clinical attachment level (CAL) and microbiologically, by Real Time-PCR for the presence of *Pg* and *fimA* genotypes type II and type IV. Subgingival biofilm samples were collected from the interproximal periodontal sites ($> PD$ and $> CAL$). The PD and CAL average of these sites were respectively: $9,5 \pm 2,2$ mm e $10,2 \pm 2,8$ mm. *P. gingivalis* was observed in 26 (65%) of individuals. *FimA* genotypes type II was detected in 16 (61,53%) while *fimA* genotypes type IV in 7 (26,92%) of those with *P. gingivalis*. However, no differences were observed between the clinical parameters of patients who presented or not the organism or its genotypes. There was also no association between the presence of genotypes and age or gender of patients. The data suggest an association between *P. gingivalis fimA* genotypes upon the occurrence of this microorganism in patients with generalized aggressive periodontitis.

Key words: Aggressive Periodontitis. Virulence Factors. Fimbriae.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
3 OBJETIVOS	25
4 MÉTODOS	26
4.1 Seleção da Amostra	26
4.2 Procedimentos Clínicos	27
4.3 Procedimentos Microbiológicos	28
4.3.1 Coleta das amostras	28
4.3.2 Avaliação Microbiológica	28
4.3.3 Análise Quantitativa de <i>P. gingivalis</i> e dos genótipos <i>fimA</i> II e <i>fimA</i> IV por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real	28
4.3.3.1 Extração de DNA das amostras de biofilme subgingival	28
4.3.3.2 Padrões para o PCR em Tempo Real	29
4.3.3.3 Análise Quantitativa de <i>P. gingivalis</i> e de cada um dos genótipos	29
4.3.3.4 Análise da Curva de Dissociação	30
4.4 Análise Estatística	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Curva Padrão	36
5.2 Análise da curva de dissociação	37
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES	51
ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

Porphyromonas gingivalis é um cocobacilo Gram-negativo, anaeróbico estrito, considerado, dentre as várias espécies que colonizam a microbiota subgingival, um importante patógeno que influencia o início e a progressão das formas severas de doença periodontal (AMANO *et al.*, 2004; LAMONT; JENKINSON, 2000). Este microrganismo está etiologicamente associado a vários tipos de doença periodontal, principalmente à periodontite crônica (BEIKLER *et al.*, 2003; DARVEAU; TANNER; PAGE, 1997; HOLT *et al.*, 1999; ZAMBON, 1996). Entretanto, nos últimos anos, alguns estudos tem reportado sua associação com a periodontite agressiva (CASARIN *et al.*, 2010; DA SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011; MIURA *et al.*, 2005; TONETTI; MOMBELLI, 1999).

Apesar da forte relação entre *P. gingivalis* e periodontite, esta bactéria também pode ser detectada em indivíduos periodontalmente saudáveis com ausência de sinais de inflamação gengival, sugerindo a existência de variações em sua virulência (GRIFFEN *et al.*, 1999). Inúmeros fatores, como a presença de lipopolissacarídeos, proteinases e fímbrias, exercem papéis importantes na adesão às células hospedeiras e na indução da produção de citocinas inflamatórias (HAMADA *et al.*, 1998; HOLT *et al.*, 1999). As fímbrias são componentes filamentosos presentes na superfície celular que desempenham um importante papel na colonização e invasão dos tecidos periodontais (HAMADA *et al.*, 1998; HIRAMINE *et al.*, 2003).

A fímbria principal de *P. gingivalis* é codificada pelo gene *fimA* que foi classificado em seis genótipos (tipos I, Ib, II, III, IV e V), com base na sequência de nucleotídeos (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000; NAKAGAWA *et al.*, 2000; NAKAGAWA *et al.*, 2002b). Estes genótipos também estão relacionados a diferentes condições periodontais (AMANO *et al.*, 2000; AMANO *et al.*, 2004; AKIYAMA *et al.*, 2006; BEIKLER *et al.*, 2003; MISSAILIDIS *et al.*, 2004; TAMURA *et al.*, 2005). O genótipo *fimA* tipo II é o mais prevalente entre isolados de pacientes com periodontite (AMANO *et al.*, 2004; BEIKLER *et al.*, 2003; MISSAILIDIS *et al.*, 2004). Por outro lado, o tipo IV é o segundo mais associado a casos de periodontite no Japão (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000). De acordo com a literatura consultada, apenas o estudo de Miura *et al.* (2005) especificou a ocorrência dos diferentes genótipos em pacientes com periodontite agressiva, destacando a associação do genótipo *fimA* tipo II com esta doença.

Achados de genótipos isolados e idênticos de periodontopatógenos entre membros familiares com convívio prolongado pode ser o evento inicial do processo de destruição periodontal (VAN STEENBERGEN *et al.*, 1993). Vários estudos demonstraram que *P. gingivalis* pode ser transmitida entre cônjuges e membros de uma mesma família (ASANO *et al.*, 2003; ASIKAINEN; CHEN; SLOTS, 1996; SAARELA *et al.*, 1993; TUIITE-MCDONNELL *et al.*, 1997; VAN STEENBERGEN *et al.*, 1993). Segundo Asano *et al.* (2003), algumas cepas de *P. gingivalis* são mais transmissíveis e/ou colonizam mais eficientemente do que outras, sendo o genótipo *fimA* II um importante fator para a transmissão de *P. gingivalis* entre cônjuges.

Exames dependentes de cultura são considerados métodos clássicos de diagnóstico e podem ser empregados na detecção de espécies bacterianas presentes na microflora subgingival (LAU *et al.*, 2004). Contudo, estas técnicas estão em desuso por apresentarem várias limitações, como o tempo despendido e a menor sensibilidade (MISSAILIDIS *et al.*, 2004). Diante dessas desvantagens, técnicas, como a utilização de sondas de DNA e a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), estão sendo utilizadas. O PCR oferece a vantagem da alta sensibilidade, permitindo não apenas a detecção da presença do microrganismo em amostras de placa bacteriana, como também a identificação de algum tipo de variabilidade genética associada a este. A reação de amplificação em tempo real (PCR *Real Time*) representa um grande avanço nos métodos de análise da microbiota, uma vez que apresenta grande especificidade e sensibilidade. Esta técnica detecta de forma precisa os microrganismos-alvo e permite uma análise quantitativa dos organismos presentes na amostra (BOUTAGA *et al.*, 2003; LAU *et al.*, 2004).

Variações na prevalência de *P. gingivalis* em pacientes com periodontite agressiva e na presença dos genótipos *fimA*, influenciadas pela etnia, localização geográfica e pela condição da população estudada, justificam a necessidade da realização de estudos em diferentes populações e raças. Além disso, é importante avaliar a presença e a expressão dos diferentes tipos de virulência, relacionando estes achados com o comportamento clínico da doença periodontal, contribuindo assim para a identificação de indivíduos de risco. Este estudo pretende avaliar o perfil clínico periodontal e microbiológico dos indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada, na cidade de Fortaleza, estado do Ceará, no Nordeste brasileiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Seleção dos Estudos

Para a seleção dos artigos utilizados nesta revisão, foi realizada uma busca na base bibliográfica *PubMed* (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), utilizando os seguintes descritores: “periodontite agressiva”, “fatores de virulência”, “fímbria” e “*fimA*” devidamente traduzidos para a língua inglesa. Os descritores foram utilizados isoladamente ou em combinações. Além disso, buscas utilizando os mesmos tópicos foram realizadas nos periódicos que publicam estudos sobre Microbiologia Oral.

Foram incluídos nesta revisão apenas estudos clínicos que procuraram avaliar a relação entre as condições periodontais e os diferentes genótipos de *fimA*. Foram selecionados quatorze estudos que estão dispostos no quadro abaixo em ordem cronológica de publicação (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000; AMANO *et al.*, 2001; ASANO *et al.*, 2003; BEIKLER *et al.*, 2003; MISSAILIDIS *et al.*, 2004; VAN DER PLOEG *et al.*, 2004; FUJISE *et al.*, 2005; MIURA *et al.*, 2005; TAMURA *et al.*, 2005; AKIYAMA *et al.*, 2006; DAVILA-PEREZ *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Quadro 1 – Estudos que avaliaram a condição periodontal e sua relação com os diferentes genótipos de *fimA*

AUTOR (ANO)	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	CONDIÇÃO PERIODONTAL*	MÉTODO	PRINCIPAIS ACHADOS
Amano <i>et al.</i> (1999)	Biofilme subgengival e saliva de 93 indivíduos japoneses (19-79 anos)	Periodontite (PS \geq 4 mm)	PCR	<ul style="list-style-type: none"> - <i>P. gingivalis</i> foi detectada em 73 pacientes (78,5%). - Um único gene de <i>fimA</i> foi detectado na maioria dos pacientes. - A distribuição dos quatro tipos de <i>fimA</i> entre os pacientes positivos para <i>P. gingivalis</i> foi: tipo II (58,9%), tipo IV (12,3%), tipo III (6,8%) e tipo I (5,4%). - Cepas de <i>P. gingivalis</i> do tipo II são mais predominantes em pacientes com periodontite. - <i>P. gingivalis</i> com <i>fimA</i> tipo II foi detectada mais frequentemente em bolsas periodontais profundas.
Amano <i>et al.</i> (2000)	Biofilme dental de 519 indivíduos: 380 adultos saudáveis periodontalmente e 139 pacientes com periodontite (30-70 anos)	Saudáveis e periodontite (PS $>$ 5 mm)	PCR	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Pg</i> foi detectada em 36,3% dos indivíduos saudáveis e em 87,1% dos pacientes com periodontite. - Dentre os adultos saudáveis, positivos para <i>Pg</i>, <i>fimA</i> tipo I foi a mais prevalente (76,1%), seguida pelo tipo V. - A maioria dos pacientes com periodontite apresentaram <i>fimA</i> tipo II (66,1%), seguida pelo tipo IV.
Amano <i>et al.</i> (2001)	Biofilme subgengival de 67 adultos jovens japoneses com Síndrome de Down e 41 indivíduos com deficiência mental (20-35anos)	Periodontite (PS \geq 3,5 mm) e Gengivite	PCR	<ul style="list-style-type: none"> - A ocorrência de <i>P. gingivalis</i> com <i>fimA</i> tipo II foi significativamente associada à periodontite nos grupos com Síndrome de Down e com doença mental (<i>odds ratios</i> de 6,32% e 12,03%, respectivamente). - Os genótipos <i>fimA</i> tipos I e II foram frequentemente detectados nos grupos de pacientes com gengivite.

Quadro 1 – Estudos que avaliaram a condição periodontal e sua relação com os diferentes genótipos de *fimA*

AUTOR (ANO)	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	CONDIÇÃO PERIODONTAL*	MÉTODO	PRINCIPAIS ACHADOS
Asano <i>et al.</i> (2003)	Biofilme de 14 pacientes com periodontite e seus respectivos cônjuges (30-70 anos) e 32 amostras de biofilme subgengival de 47 pacientes com periodontite (24 -70 anos)	Periodontite (pelo menos 4 sítios com PS > 4 mm e pelo menos 1 defeito intraósseo)	Padrão de eletroforese em campo pulsado PCR	- <i>fimA</i> tipo II foi detectada em cinco de seis casais (83,3%) com cepas idênticas de <i>P. gingivalis</i> . - A proporção de <i>fimA</i> tipo II em cepas isoladas de casais com provável transmissão intrafamiliar foi significativamente maior do que no grupo de pacientes com periodontite ou no grupo de casais sem evidência de transmissão.
Beikler <i>et al.</i> (2003)	Biofilme subgengival (<i>pool</i>) de 102 indivíduos caucasianos (positivos para <i>Pg</i>)	Periodontite crônica ou agressiva (moderada a severa)	PCR	- <i>Pg</i> foi detectada em 50,25% dos indivíduos caucasianos com periodontite. - Os genótipos <i>fimA</i> tipos II, I e IV foram predominantes em pacientes caucasianos com periodontite. - Não houve diferença estatística na associação entre os vários genótipos de <i>fimA</i> e a severidade da doença.
Missailidis <i>et al.</i> (2004)	Biofilme subgengival de 102 indivíduos (14-75 anos) de uma população multirracial do Brasil	Saudáveis, gengivite, periodontite crônica e periodontite agressiva	PCR	- <i>Pg</i> foi detectada em 51 dos 57 pacientes com periodontite (89,4%). - <i>P. gingivalis</i> foi detectada em 146 dos 302 sítios analisados (48,3%). - <i>Pg</i> foi detectada em 11 dos 133 sítios sem destruição periodontal (8,3%) e em 135 dos 169 sítios com periodontite (79,9%). - Cepas tipo II de <i>P. gingivalis</i> seguidas pelo tipo Ib são mais prevalentes em pacientes com periodontite.

Quadro 1 – Estudos que avaliaram a condição periodontal e sua relação com os diferentes genótipos de *fimA*

AUTOR (ANO)	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	CONDIÇÃO PERIODONTAL*	MÉTODO	PRINCIPAIS ACHADOS
Van der Ploeg <i>et al.</i> (2004)	Biofilme dental (<i>pool</i>) de 50 indivíduos europeus: 17 com periodontite crônica (38 - 81 anos) e 33 periodontalmente saudáveis (19 - 46 anos)	Periodontite Crônica (≥ 4 sítios com PS e perda de inserção ≥ 4 mm) e saudáveis	PCR em tempo real Imunofluorescência	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Pg</i> foi detectada em 71% das amostras de pacientes com periodontite crônica e em 9% das amostras de indivíduos saudáveis. - 73% das amostras positivas para <i>P. gingivalis</i> apresentavam múltiplos genótipos <i>fimA</i>. - Genótipo II predominou em 60% das amostras. - Genótipo IV apresentou prevalência similar ao do genótipo II (73%), mas predominou em apenas 20% das amostras.
Fujise <i>et al.</i> (2005)	Biofilme subgingival de sítios profundos (PS ≥ 4 mm) e com sangramento à sondagem	Periodontite crônica	PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Os dados iniciais mostraram uma maior frequência de sítios positivos para <i>fimA</i> tipo II do que para os tipos Ib e I. - A investigação longitudinal indicou que os sítios inicialmente positivos para <i>fimA</i> tipo I apresentaram uma maior frequência de sangramento à sondagem persistente após o tratamento do que os sítios negativos para <i>fimA</i> tipo I (51,6% <i>versus</i> 27.9%).
Miura <i>et al.</i> (2005)	Biofilme subgingival de 40 indivíduos japoneses: 18 pacientes com periodontite agressiva (19-34 anos) e 22 adultos jovens periodontalmente saudáveis (19-31 anos)	Periodontite agressiva (múltiplos sítios com PS > 5 mm) e saudáveis	PCR em tempo real	<ul style="list-style-type: none"> - Maior prevalência de <i>fimA</i> tipo II em pacientes com periodontite agressiva. O segundo genótipo mais prevalente foi o tipo Ib, seguido pelo tipo I. - <i>fimA</i> tipo I foi o único genótipo detectado em pacientes adultos jovens saudáveis periodontalmente. - O nível de <i>Pg</i> foi significativamente maior em sítios com <i>fimA</i> tipo I do que em sítios com tipo II ou Ib, em pacientes com periodontite agressiva.

Quadro 1 – Estudos que avaliaram a condição periodontal e sua relação com os diferentes genótipos de *fimA*

AUTOR (ANO)	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	CONDIÇÃO PERIODONTAL*	MÉTODO	PRINCIPAIS ACHADOS
Tamura <i>et al.</i> (2005)	650 amostras de saliva de 464 crianças e adolescentes japoneses (3 - 18 anos)	Gengivite	PCR	<ul style="list-style-type: none"> - 3,23% (15) das crianças e adolescentes analisadas foram positivas para <i>Pg</i>. Todas apresentavam quadro de gengivite e estavam na faixa etária de 6 anos e 7 meses a 16 anos e 7 meses. - Os genótipos I, IV, III e Ib foram detectados em 4, 3, 2 e 1 indivíduo, respectivamente. Cinco indivíduos apresentaram genótipos não identificados. O genótipo II não foi detectado. - O genótipo <i>fimA</i> tipo IV, relacionado à periodontite, foi o segundo genótipo mais frequente em adolescentes.
Akiyama <i>et al.</i> (2006)	Biofilme subgengival de 75 indivíduos epiléticos (10-35 anos) que faziam uso de fenitoína	Crescimento gengival induzido por fenitoína classificado de acordo com a PS: não observado (PS ≤ 3 mm), moderado (PS entre 3-5 mm) e severo (PS > 5 mm)	<p>PCR convencional</p> <p>PCR em tempo real</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Genótipo <i>fimA</i> tipo II foi significativamente mais prevalente nos casos moderados e severos de crescimento gengival induzido por fenitoína, enquanto o tipo IV predominou em sítios não doentes. - Os resultados sugerem que <i>Treponema denticola</i> e <i>Porphyromonas gingivalis</i> com <i>fimA</i> tipo II são agentes causais do crescimento gengival induzido por fenitoína.

AUTOR (ANO)	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	CONDIÇÃO PERIODONTAL*	MÉTODO	PRINCIPAIS ACHADOS
Davila-Perez <i>et al.</i> (2007)	Biofilme subgengival de 75 indivíduos colonizados por <i>Pg</i> . Grupo 1: 25 indivíduos sem diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e sem periodontite. Grupo 2: 25 indivíduos sem DMT2 e com periodontite Grupo 3: 25 indivíduos com DMT2 e com periodontite	Periodontite (perda de inserção e PS > 5 mm em pelo menos 10 sítios)	PCR	<ul style="list-style-type: none"> - <i>fimA</i> tipo I foi o mais frequentemente detectado (40%) em indivíduos sem DMT2 e sem periodontite. - <i>fimA</i> tipo Ib foi o genótipo mais frequentemente detectado (20%) em indivíduos sem DMT2 e com periodontite . - Em pacientes com DMT2 e com periodontite, os genótipos <i>fimA</i> tipo I (20%) e tipo III (20%) foram os mais frequentemente detectados.
Zhao <i>et al.</i> (2007)	Biofilme subgengival de 251 indivíduos chineses (25-75 anos): 115 com periodontite crônica e 136 com saúde periodontal	Periodontite Crônica (PS > 4 mm) e saudáveis	PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Genótipo <i>fimA</i> tipo I foi mais prevalente em adultos saudáveis. - Genótipo <i>fimA</i> tipo II, seguido do genótipo IV, foram detectados no grupo de periodontite crônica.
Teixeira <i>et al.</i> (2009)	Biofilme subgengival de sítios com diferentes profundidades à sondagem de 20 indivíduos brasileiros fumantes (30-52 anos)	Periodontite Crônica (pelo menos um sítio não contíguo com PS entre 5 e 7 mm e perda de inserção clínica entre 5 e 10 mm)	PCR em tempo real	<ul style="list-style-type: none"> - <i>P. gingivalis</i> e genótipo <i>fimA</i> tipo IV foram detectados em todos os indivíduos. O genótipo <i>fimA</i> tipo II foi detectado em 18 (90%) indivíduos. - Os genótipos <i>fimA</i> II e <i>fimA</i> IV foram detectados em 47 (28%) e 117 sítios (69,6%), respectivamente. - O aumento dos níveis do genótipo IV foi associado ao aumento da profundidade à sondagem.

PCR- Reação em cadeia da polimerase
Pg- *Porphyromonas gingivalis*

PS- Profundidade de sondagem
fimA- genótipo de *Porphyromonas gingivalis*

* da forma como descrita pelos autores

Porphyromonas gingivalis é um patógeno periodontal predominante que expressa inúmeros fatores de virulência que podem contribuir para a patogênese da periodontite. Dentre eles, as fímbrias principais de *P. gingivalis* são importantes fatores que influenciam a iniciação e progressão da doença (HAMADA *et al.*, 1998). As fímbrias são as principais estruturas responsáveis pela aderência da bactéria aos componentes salivares humanos e a uma variedade de células do hospedeiro, como: macrófagos, células epiteliais e fibroblastos (AMANO, 2003). Além disso, as fímbrias são essenciais para a invasão bacteriana e a colonização da cavidade oral (NAKAGAWA *et al.*, 2002b). A fímbria principal de *P. gingivalis* é codificada pelo gene *fimA* e variações alélicas neste gene podem diferenciar a bactéria quanto ao seu potencial patogênico. Baseado nestas variações, seis genótipos foram identificados: *fimA* I, Ib, II, III, IV e V (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000; NAKAGAWA *et al.*, 2000; NAKAGAWA *et al.*, 2002b).

Estudos têm demonstrado que fímbrias de *P. gingivalis* são capazes de induzir a produção de citocinas, como a interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 e o TNF- α (fator de necrose tumoral), a partir de fibroblastos, macrófagos e células epiteliais (HANAZAWA *et al.*, 1991; HIROSE *et al.*, 1996; OGAWA; UCHIDA; HAMADA, 1994). Estas citocinas são mediadores imunológicos importantes na inflamação periodontal e na destruição do tecido periodontal. Sugano *et al.* (2004) avaliaram dois tipos *fimA* de *P. gingivalis* (I e II) quanto ao seu grau de indução de citocina e observaram que *fimA* tipo II prolonga o tempo de resposta da citocina.

Diferenças nos potenciais de virulência dos genótipos *fimA* foram avaliadas através de modelo para injeção subcutânea em roedores ou modelo de abscesso em camundongos (INABA *et al.*, 2008; NAKANO *et al.*, 2004). Segundo Nakano *et al.* (2004), o genótipo II, seguido dos tipos Ib, IV e V, causa sintomas infecciosos e alterações inflamatórias mais fortes do que os genótipos I e III. Nakagawa *et al.* (2002a) relataram que clones *fimA* tipo II apresentam maior capacidade de aderir e invadir células epiteliais humanas do que os outros tipos de clones *fimA*.

Genótipos *fimA* tipo II foram frequentemente associados a vários tipos de doença periodontal, como periodontite crônica avançada (VAN DER PLOEG *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2007), periodontite agressiva (MIURA *et al.*, 2005) e periodontite refratária (ENERSEN, 2008). Além disso, a presença do genótipo *fimA* tipo II de *P. gingivalis* demonstrou ter uma relação significativa com o crescimento gengival induzido por fenitoína, sendo mais prevalente em sítios

com crescimento gengival moderado e severo (profundidade à sondagem 3-5mm e > 5 mm) (AKIYAMA *et al.*, 2006).

Estudos relacionaram a distribuição dos genótipos *fimA* de *P. gingivalis* com os parâmetros clínicos periodontais (AMANO *et al.*, 1999; FUJISE *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2007). O genótipo *fimA* II foi detectado mais frequentemente em bolsas periodontais profundas e uma diferença significativa de ocorrência foi observada entre bolsas rasas (4 mm) e profundas (≥ 8 mm) (AMANO *et al.*, 1999). Zhao *et al.* (2007) observaram uma maior prevalência dos genótipos *fimA* tipo II e IV nos grupos de indivíduos com periodontite crônica que apresentaram profundidade de sondagem de 4-6 mm e ≥ 7 mm e sangramento à sondagem. Estes resultados demonstraram associação dos genótipos II e IV com a iniciação e progressão da periodontite. Fujise *et al.* (2005), através de um estudo longitudinal, concluíram que os sítios positivos para *fimA* tipo I apresentaram uma frequência maior de sangramento à sondagem persistente após o tratamento não-cirúrgico do que os sítios negativos para *fimA* tipo I. Teixeira *et al.* (2009) correlacionaram níveis de genótipos II e IV de *fimA* de *P. gingivalis* e profundidade de sondagem em pacientes fumantes com periodontite crônica e observaram que os níveis de *P. gingivalis* foram maiores em bolsas periodontais profundas (≥ 7 mm) do que em rasas ou intermediárias. Os autores não observaram diferença no nível médio do genótipo II de acordo com a profundidade de sondagem. Contudo, os níveis de genótipo IV aumentaram de forma significativa com o aumento da profundidade de sondagem. Através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, Zhao *et al.* (2007) observaram uma incidência menor do genótipo *fimA* tipo IV no grupo com profundidade de sondagem ≥ 7 mm do que no grupo com profundidade de sondagem de 4-6 mm.

Estudos sugerem a relação da distribuição dos genótipos *fimA* com a idade e/ou gênero dos participantes envolvidos (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000; TAMURA *et al.*, 2005). Amano *et al.* (1999) e Amano *et al.* (2000) destacaram a maior prevalência do genótipo *fimA* tipo II em pacientes com periodontite na faixa etária de 36 a 57 anos (preferencialmente mulheres) e na faixa etária de 30 a 70 anos, respectivamente. Tamura *et al.* (2005) investigaram a distribuição dos genótipos *fimA* de *P. gingivalis* em 15 crianças e adolescentes na faixa etária de 6 a 16 anos com quadro de gengivite. Os autores detectaram a presença dos genótipos *fimA* tipos I, Ib, III e IV. O tipo IV foi encontrado em três participantes mais velhos (11 anos e 6 meses, 16 anos e 1 mês e 16 anos e 7 meses). Por outro lado, o genótipo

fimA tipo II de *P. gingivalis* não foi detectado na amostra analisada. Diferente dos estudos acima citados, Zhao *et al.* (2007) não encontraram diferença significativa entre a distribuição dos vários genótipos *fimA* e a idade, em uma amostra de 94 indivíduos positivos para *P. gingivalis* com periodontite crônica.

Os genótipos *fimA* tipos II e IV foram amplamente distribuídos entre indivíduos adultos com periodontite (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000). Amano *et al.* (1999) investigaram a prevalência de quatro genótipos *fimA* de *P. gingivalis* (tipos I, II, III e IV) em amostras de saliva e biofilme de 93 pacientes com periodontite, na faixa etária de 19 a 79 anos, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *P. gingivalis* foi detectada em 78,5% dos indivíduos e o genótipo mais prevalente foi o tipo II (68,4%), seguido do tipo IV. Posteriormente, Nakagawa *et al.* (2000) investigaram a presença do genótipo *fimA* tipo V na amostra do estudo de Amano *et al.* (1999). Os autores destacaram a ocorrência do genótipo tipo V em 12 dos 73 (16,4%) indivíduos positivos para *P. gingivalis*. Estes achados foram confirmados por Amano *et al.* (2000) com uma amostra de 139 pacientes com periodontite na faixa etária de 30 a 70 anos. Ambos os estudos ocorreram em uma área limitada, próximo a Osaka, Japão, e os indivíduos envolvidos pertenciam a uma mesma raça (japonesa). Além disso, os indivíduos analisados apresentaram cepas de *fimA* sem tipo identificado, indicando que mais do que cinco genótipos (I, II, III, IV e V) poderiam existir relacionados a *P. gingivalis*.

Amano *et al.* (2001) também observaram uma associação significativa entre o genótipo *fimA* tipo II e periodontite em pacientes com Síndrome de Down e em indivíduos saudáveis sistemicamente com deficiência mental na faixa etária de 20 a 35 anos. Apesar de não ter sido associado à periodontite, o genótipo *fimA* tipo I foi frequentemente detectado e o tipo IV foi encontrado em uma menor frequência, contrastando com os estudos de Amano *et al.* (1999) e Amano *et al.*, (2000). Contudo, com a identificação do genótipo *fimA* tipo Ib, Nakagawa *et al.* (2002) reavaliaram as amostras do estudo de Amano *et al.* (2001) e destacaram a relação do tipo Ib, variante do *fimA* tipo I, com a periodontite em indivíduos com Síndrome de Down ou com deficiência mental. Além disso, os autores identificaram a forte relação entre periodontite e tipos específicos de *fimA*, como: tipo II, IV e Ib em uma amostra de 192 indivíduos com periodontite positivos para *P. gingivalis*. Os tipos I e V foram detectados em frequências menores.

Três estudos, citados no quadro 1, investigaram a distribuição dos genótipos *fimA* de *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite crônica (TEIXEIRA *et al.*, 2009; VAN DER

PLOEG *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2007). De acordo com os achados, os genótipos *fimA* tipos II e IV foram frequentemente detectados no grupo de pacientes, porém diferenças na prevalência dos genótipos foram observadas entre os estudos. No estudo de Zhao *et al.* (2007), o genótipo *fimA* tipo II foi frequentemente detectado (43,6%) no grupo de pacientes, seguido pelo tipo IV (30,9%). Por outro lado, os estudos de Van der Ploeg *et al.* (2004) e Teixeira *et al.* (2009) revelaram uma prevalência maior do genótipo *fimA* tipo IV comparada com o tipo II, através da análise das amostras de biofilme subgengival pela técnica do PCR em tempo real.

A distribuição dos genótipos *fimA* de *P. gingivalis* em indivíduos com quadro de gengivite foi investigada em estudos no Japão e no Brasil (AMANO *et al.*, 2001; MISSAILIDIS *et al.*, 2004; TAMURA *et al.*, 2005). De acordo com os estudos de Amano *et al.* (2001) e de Tamura *et al.* (2005), o genótipo *fimA* tipo I foi o mais prevalente em adultos jovens, crianças e adolescentes com gengivite e diferentes condições sistêmicas. O segundo genótipo mais prevalente foi o tipo IV e o tipo II na faixa etária de 6 a 16 anos e 20 a 35 anos, respectivamente. No Brasil, indivíduos com quadro de gengivite na faixa etária de 14 a 75 anos apresentaram o genótipo *fimA* tipo IV como sendo o mais prevalente, seguido dos tipos I e II (MISSAILIDIS *et al.*, 2004). A presença dos genótipos *fimA* tipo II e IV em indivíduos com gengivite pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença periodontal, visto que a ocorrência destes genótipos foi associada à periodontite (AMANO *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2007).

Estudos na Alemanha e Brasil (BEIKLER *et al.*, 2003; MISSAILIDIS *et al.*, 2004), envolvendo indivíduos com quadros de periodontite (crônica e agressiva), apresentaram diferenças na prevalência de *P. gingivalis* (50,25% e 89,5%, respectivamente). Estas variações na prevalência podem ter sido influenciadas pelas diferenças na etnia e na localização geográfica da população estudada. Com relação à prevalência dos genótipos *fimA*, Beikler *et al.* (2003) e Missailidis *et al.* (2004) relataram que o genótipo *fimA* tipo II foi o mais prevalente no grupo de pacientes, seguido pelos tipos I e Ib, respectivamente. De forma semelhante, Miura *et al.* (2005), em estudo qualitativo envolvendo pacientes japoneses com periodontite agressiva, detectaram mais frequentemente o genótipo II, seguido pelos tipos Ib e I. Já em indivíduos saudáveis, o genótipo I foi o único detectado. Contudo, é importante destacar que os níveis de *P. gingivalis* do tipo *fimA* I foram menores nos sítios de indivíduos saudáveis periodontalmente do que nos sítios *fimA* tipo I de pacientes com periodontite agressiva. Em indivíduos mexicanos com diabetes mellitus tipo II e com quadro de periodontite, Davila-Perez *et al.* (2007) observaram uma maior

prevalência dos genótipos *fimA* tipos I e III. Por outro lado, nos pacientes sem diabetes, mas com periodontite, o genótipo *fimA* tipo Ib foi o mais frequentemente detectado, seguido pelo tipos II e I. De acordo com os resultados relatados, observa-se que o genótipo *fimA* tipo I pode ser detectado tanto em sítios de pacientes com periodontite quanto em sítios de indivíduos saudáveis, porém o potencial patogênico será influenciado pelo aumento quantitativo de *P. gingivalis* do tipo *fimA* I nos sítios. De acordo com Miura *et al.* (2005), apesar do *fimA* tipo I apresentar uma menor capacidade para aderir e invadir tecidos do hospedeiro do que o *fimA* tipo II, o aumento do número de *P. gingivalis* com *fimA* tipo I pode facilitar a ação dos fatores de virulência (fímbria e proteinases).

Miura *et al.* (2005) investigaram em seu estudo a prevalência dos genótipos de *fimA* de *P. gingivalis* em dezoito japoneses com periodontite agressiva. Os participantes deveriam exibir destruição periodontal severa e profundidade a sondagem > 5 mm em múltiplos sítios. Os autores ressaltaram a forte associação entre o genótipo do tipo II e o quadro de periodontite agressiva, porém destacaram que o nível de *P. gingivalis* nos sítios com *fimA* tipo I foi significativamente maior do que nos sítios colonizados pelos outros genótipos. Estes achados diferem dos resultados encontrados por outros estudos também com a população asiática, onde os genótipos *fimA* tipos II e IV foram frequentemente detectados em pacientes com periodontite e o genótipo *fimA* tipo I foi encontrado apenas em indivíduos com saúde periodontal (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000). O estudo de Miura *et al.* (2005) foi o único que analisou, especificamente, a prevalência dos genótipos *fimA* em pacientes com periodontite agressiva, impossibilitando uma comparação com os estudos de Beikler *et al.* (2003) e Missailidis *et al.* (2004) que apresentaram, em conjunto, a distribuição dos diferentes genótipos em indivíduos com periodontite (crônica ou agressiva). Além disso, é importante destacar que o estudo de Miura *et al.* (2005) utilizou uma técnica quantitativa (PCR em tempo real) para a análise microbiológica e os demais estudos utilizaram um método quantitativo (PCR convencional).

Estudos prévios realizados no Japão revelaram uma forte associação entre *P. gingivalis* e periodontite agressiva nessa população (TAKEUCHI *et al.*, 2003; YANO-HIGUCHI *et al.* 2000). Segundo Zhao *et al.* (2007), a proporção de *P. gingivalis* varia entre indivíduos de diferentes etnias, localizações geográficas e condições periodontais e, conseqüentemente, algumas populações apresentam maior risco de desenvolver doença periodontal do que outras. No Brasil, Faveri *et al.* (2009) comparam o perfil microbiano de indivíduos com periodontite

crônica, periodontite agressiva generalizada e periodontite agressiva localizada e destacaram que os níveis de *P. gingivalis* foram mais elevados nos indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Cortelli *et al.* (2005), em estudo com indivíduos brasileiros com quadros de periodontite agressiva e crônica, relataram que *Porphyromonas gingivalis* foi o patógeno periodontal mais prevalente em ambos os grupos estudados, sendo detectado em 80% e 68% dos indivíduos, respectivamente. De forma semelhante, Gajardo *et al.* (2005) encontraram uma prevalência elevada de *P. gingivalis* em indivíduos chilenos com periodontite agressiva e periodontite crônica (88,8% e 76,4%, respectivamente). Braga *et al.* (2010) detectaram *P. gingivalis* em 70% dos pacientes brasileiros (30-60 anos) com periodontite crônica. No sudeste asiático (Tailândia), *P. gingivalis* foi encontrada em 70,9% dos 453 indivíduos (39-59 anos) com periodontite crônica (TORRUNGRUANG *et al.*, 2009). Beikler *et al.* (2003), na Alemanha, encontraram 102 indivíduos caucasianos (50,25%), com quadro de periodontite (crônica ou agressiva), colonizados por *P. gingivalis*.

Familiares com periodontite severa infectados por *P. gingivalis* podem ser uma fonte de infecção para os outros membros da família e informações sobre essa transmissão podem ser importantes na prevenção de novas infecções (ASANO *et al.*, 2003). Estudos prévios investigaram a possibilidade de transmissão de cepas de *P. gingivalis* entre cônjuges pela utilização de vários métodos, como: endonuclease de restrição do DNA e PCR com primers arbitrários (ASIKAINEN; CHEN; SLOTS, 1996; VAN STEENBERGEN *et al.*, 1993). Em seus achados, Asano *et al.* (2003) demonstraram que o padrão de eletroforese em campo pulsado de cepas de *P. gingivalis* de maridos e esposas correspondentes foi idêntico para seis dos 14 casais selecionados. Em cinco destes seis casais (83,3%), cepas de *P. gingivalis* eram *fimA* tipo II, sugerindo que o tipo II é um importante fator para a transmissão de *P. gingivalis* entre os cônjuges. No intuito de avaliar a probabilidade de transmissão de *P. gingivalis* em famílias com periodontite, Asikainen, Chen e Slots (1996) relataram que famílias que tem um dos cônjuges positivos para *P. gingivalis* apresentam a probabilidade de transmissão interconjugal de 20%. Por outro lado, crianças apresentam um risco muito menor de serem infectadas com a cepa de *P. gingivalis* de um pai infectado. Tuite-McDonnell *et al.* (1997) examinaram 564 indivíduos (4 bisavós, 165 avós, 206 pais e 189 filhos) de 104 famílias oriundas de Ohio (EUA) no intuito de investigar a transmissão de *P. gingivalis* nestas famílias. Os autores destacaram que o contato

com uma pessoa da família infectada pela bactéria aumenta substancialmente o risco de colonização em casais, crianças e seus pais, adultos e suas mães e irmãos.

3 OBJETIVOS

- Detectar a presença de *P. gingivalis* e dos genótipos *fimA* II e *fimA* IV de *P. gingivalis* em indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada.
- Relacionar a presença de *P. gingivalis* e dos genótipos *fimA* II e *fimA* IV com os parâmetros clínicos.

4 MÉTODOS

4.1 Seleção da Amostra

Este foi um estudo transversal, realizado com suporte na avaliação de 40 pacientes portadores de periodontite agressiva generalizada. Dentre os pacientes da amostra, foram analisados nove pares de familiares, sendo cinco pares de irmãos e quatro de pais e filhos.

Os participantes foram selecionados dentre os que procuraram atendimento na Clínica de Periodontia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, Brasil. A unidade é uma das referências para o tratamento de doenças periodontais no Estado do Ceará e na Região Metropolitana de Fortaleza.

Os portadores de periodontite agressiva foram classificados de acordo com os critérios clínicos sugeridos pela Academia Americana de Periodontologia (AAP) (TONETTI; MOMBELLI, 1999):

- periodontite agressiva localizada - perda de inserção interproximal em pelo menos dois dentes permanentes, um dos quais primeiro molar, e envolvendo não mais do que dois dentes além de incisivos e primeiros molares; e

- periodontite agressiva generalizada - perda de inserção interproximal generalizada, afetando três dentes permanentes além de incisivos e primeiros molares.

Tanto a periodontite agressiva localizada quanto a forma generalizada deveriam acometer indivíduos sistemicamente saudáveis e com rápida perda de inserção e destruição óssea.

Os indivíduos não deveriam ter recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses, ter realizado antibioticoterapia nos últimos três meses, apresentar alterações sistêmicas que interferissem nas condições periodontais, utilizar medicamentos que estivessem associados ao crescimento gengival e estar em período de gravidez ou lactação.

O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará tendo sido aprovado em 13/03/2008, sob o nº 20/08 (ANEXO A). Todos os participantes e os responsáveis foram informados sobre os propósitos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

4.2 Procedimentos Clínicos

O exame clínico periodontal foi realizado em todos os dentes, exceto terceiros molares. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Índice de placa (AINAMO; BAY, 1975) - observou-se a presença de placa bacteriana visível nas faces vestibular, palatina ou lingual, mesial e distal, sendo o índice determinado pela porcentagem das faces com placa em relação a todas as faces presentes;
- Índice gengival (AINAMO; BAY, 1975) - foi observada a presença de sangramento marginal por até dez segundos após a penetração da sonda periodontal 0,5 mm no sulco gengival, nas faces vestibular, palatina ou lingual, mesial e distal, e o índice determinado pela porcentagem das faces sangrantes em relação a todas as faces presentes;
- Profundidade de sondagem (mm) - valor obtido com base na margem gengival até o fundo do sítio periodontal; e
- Nível de inserção clínico (mm) - valor obtido da junção cimento-esmalte até o fundo do sítio periodontal.

Os parâmetros clínicos profundidade de sondagem e nível de inserção clínico foram examinados em seis sítios (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual e distolingual).

O exame clínico periodontal foi realizado com a sonda periodontal PCP-UNC 15¹ por único examinador, calibrado antes e durante o estudo, sendo utilizado um teste estatístico apropriado para estas aferições (APÊNDICE A).

¹ Trinity Indústria e Comércio Ltda., São Paulo-SP, Brasil.

4.3 Procedimentos Microbiológicos

4.3.1 Coleta das Amostras

Amostras de placa bacteriana subgingival foram coletadas com cones de papel estéreis² (tamanho 35), com a inserção de dois cones no sítio escolhido, por 20 segundos. Foram coletadas de sítios proximais de dentes com maior perda de inserção e maior profundidade de sondagem, tendo sido uma amostra representativa de cada paciente.

Previamente à coleta, a placa bacteriana supragingival foi removida com curetas ou pelotas de algodão estéreis e a área isolada com roletes de algodão estéreis. Após a coleta, as amostras foram imersas em microtubos contendo 1 ml de solução de Ringer (8,6g NaCl, 0,3g KCl, 0,33g CaCl₂.2H₂O em 1000ml H₂O) e acondicionadas sob temperatura de – 80°C, até serem manipuladas. A avaliação microbiológica foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.3.2 Avaliação Microbiológica

As amostras foram avaliadas mediante a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) quanto à presença de *P. gingivalis* (região 16S do DNA ribossômico) e dos genótipos *fimA* tipo II e tipo IV, utilizando iniciadores específicos (Tabela 1).

4.3.3 Análise Quantitativa de *P. gingivalis* e dos Genótipos *fimA* II e *fimA* IV por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

4.3.3.1 Extração de DNA das Amostras de Biofilme Subgingival

As amostras bacterianas coletadas foram previamente preparadas com o *kit* InstaGene Purification Matrix^{TM3} (APÊNDICE B) para extração do DNA.

² DENTSPLY Ind. E Com. Ltda. - Rio de Janeiro, Brasil.

³ BioRad Laboratories. Hercules, CA – EUA.

4.3.3.2 Padrões para o PCR em Tempo Real

Para obtenção da curva padrão, utilizada como parâmetro na quantificação das amostras, foram utilizadas diluições sucessivas de plasmídeos apresentando uma cópia clonada de cada gene analisado (*16SrRNA* de *P. gingivalis*, *fimA* II e *fimA* IV) e estas usadas como DNA molde em reação de PCR em tempo real. Cepas *P. gingivalis* HW24D-1 e *P. gingivalis* W83 foram utilizados como fonte de DNA para amplificação dos alelos *fimA* II e IV.

4.3.3.3 Análise Quantitativa de *P. gingivalis* e de cada um dos Genótipos

A análise quantitativa foi realizada através de PCR em tempo real, utilizando termociclador StepOnePlus^{TM4} Real-Time PCR Systems e os produtos detectados por fluorescência usando o *kit* Quantimix Easy SYG⁵, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para cada reação, foram utilizados 10 µl de Sybr[®] Green, 1µl DNA molde, 200 mM de cada iniciador (Tabela 1) e água milliQ estéril, totalizando um volume de 20µl. Para a curva padrão, foram realizadas reações contendo como DNA molde 1 a 1×10^5 cópias de cada gene analisado (*16SrRNA*, *fimA* II e *fimA* IV) utilizando-se os plasmídeos pTOPO16SPg, pTOPO*fimA*II e pTOPO*fimA*IV, respectivamente. Como controle negativo, foi adicionada água milliQ estéril ao invés de DNA molde. As reações foram realizadas com pré-incubação 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 20 segundos. Todas as reações foram feitas em placas MicroAmp⁶ optical 96-well com adesivos ópticos MicroAmp⁷.

⁴ Applied Biosystems. FosterTM City, CA – EUA.

⁵ Biotools. Madri, Espanha.

⁶ Applied Biosystems. Foster City, CA – EUA.

⁷ Applied Biosystems. Foster City, CA – EUA.

A fluorescência foi detectada após cada ciclo e representada em gráfico utilizando software StepOneTM Software v 2.1. Para garantir a especificidade dos produtos detectados por fluorescência e evitar a detecção de dímeros de iniciadores, a detecção foi realizada em uma temperatura próxima ao da temperatura de dissociação dos amplicons.

Todas as amostras e cada diluição dos plasmídeos para a curva padrão foram analisadas em triplicata.

4.3.3.4 Análise da Curva de Dissociação

Após a reação, foi realizada a curva de dissociação para verificar a especificidade dos amplicons. Foram realizados 25 ciclos de 30 segundos com aumento de 1°C por ciclo, iniciando-se em 70°C até atingir a temperatura de 95°C. A temperatura de dissociação do amplicon gerado pelos iniciadores espécie específicos para o gene 16SrRNA de *P. gingivalis* é 87,5°C e dos genes *fimA* II e *fimA* IV é 83,5°C (VAN DER PLOEG *et al.*, 2004).

Assim, a detecção da presença de *P. gingivalis* foi realizada a 83°C e dos genótipos *fimA* II e *fimA* IV a 81°C.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para determinação de *P. gingivalis*, do genótipo *fimA* II e *fimA* IV e tamanho do produto esperado.

Gene	Iniciadores	Sequência Nucleotídica (5' - 3')	Produto (pb)
<i>P. gingivalis</i>	Pg rRNAf	5' TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC 3'	
	16SrRNA	Pg rRNAr	5' ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC 3' 197
<i>fimA</i> II	<i>FimA</i> II upper	5' ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G 3'	
	<i>FimA</i> lower	5' AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A 3'	257
<i>fimA</i> IV	<i>FimA</i> IV upper	5' CTA TTC AGG TGC TAT TAC CCA A 3'	
	<i>FimA</i> lower	5' AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A 3'	251

Fonte: (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000)

⁸ Applied Buisystems, Foster City, CA – EUA.

4.4 Análise Estatística

Os dados clínicos dos indivíduos foram submetidos ao Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação desses dados entre os grupos, foram utilizados o Teste t não pareado ou o Teste de *Mann-Whitney*, quando os dados apresentaram normalidade ou não, respectivamente. Para avaliar a relação entre a presença de *P. gingivalis* e de *fimA* tipo II e *fimA* tipo IV e idade ou gênero dos pacientes foram utilizados o Teste do Qui-quadrado e análise de *odds ratio*.

Em todos os procedimentos, foi adotado um nível de significância de 5% para a tomada da decisão quanto à validade das hipóteses testadas. A análise dos dados foi realizada com a utilização do *software* GraphPad InStat⁹.

⁹ Graph Pad Software Inc. San-Diego, CA-EUA.

5 RESULTADOS

A amostra estudada foi composta por 40 indivíduos com periodontite agressiva generalizada (24 mulheres, 16 homens, com média de idade de 29,7 anos e variação de 10-42 anos). Dentre os pacientes da amostra, foram analisados nove pares de familiares, sendo cinco pares de irmãos e quatro de pais e filhos. A tabela 2 apresenta a amostra estudada com a idade e as características clínicas periodontais, referentes a índice de placa (IP), índice gengival (IG), PS (profundidade de sondagem) e NIC (nível de inserção clínico). A média de PS e de NIC de todos os sítios analisados foi respectivamente, $3,5 \text{ mm} \pm 0,8 \text{ mm}$ e $3,9 \text{ mm} \pm 1,1 \text{ mm}$. A média de IP foi $31,2 \% \pm 18,5 \%$ e a média de IG de $14,1 \% \pm 9,2 \%$.

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes com periodontite agressiva pela idade e características clínicas periodontais

GRUPO	PERIODONTITE AGRESSIVA (PAG)
N	40
Média de idade em anos (variação)	29,7 ± 8,1 (10-42)
PS (média mm)	3,5 ± 0,8
NIC (média mm)	3,9 ± 1,1
IG (média %)	14,1 ± 9,2
IP (média %)	31,2 ± 18,5

PS - profundidade de sondagem
 IG - índice gengival
 NIC - nível de inserção clínico
 IP - índice de placa

A tabela 3 apresenta a condição periodontal de acordo com a presença ou ausência de *P. gingivalis* no grupo estudado. Dos 40 pacientes com periodontite agressiva, 26 (65%) indivíduos, com média de idade de 31,4 anos, estavam positivos para *P. gingivalis*. Não foi observada diferença estatística quando comparados os valores de PS e NIC do sítio coletado dos pacientes positivos e negativos para *P. gingivalis*.

Tabela 3 – Presença de *P. gingivalis* e média de parâmetros clínicos periodontais nos sítios utilizados para análise microbiana

GRUPOS	PERIODONTITE AGRESSIVA (Pg +)	PERIODONTITE AGRESSIVA (Pg -)
N	26	14
%	(65%)	(35%)
Média de idade em anos (variação)	31,4 ± 8,0 (10-42)	26,8 ± 7,9 (14-42)
PS (mm) (SC)	9,1 ± 2,3	8,4 ± 2,4
NIC (mm) (SC)	9,6 ± 3,0	9,1 ± 3,3

PS- profundidade de sondagem NIC – nível de inserção clínico
 SC – sítio coletado para análise microbiológica
 (Pg+) presença de *P. gingivalis* (Pg-) ausência de *P. gingivalis*

A distribuição dos genótipos *fimA* tipo II e tipo IV de *P. gingivalis* em 26 indivíduos com periodontite agressiva positivos para *P. gingivalis* está apresentada na tabela 4. Dentre os indivíduos positivos para *P. gingivalis*, 11 (42%) apresentaram genótipo *fimA* tipo II, 02 (8%) genótipo *fimA* tipo IV, 05 (19%) genótipos *fimA* tipos II e IV e 8 indivíduos (31%) não apresentaram nenhum dos genótipos analisados. O genótipo *fimA* tipo II foi frequentemente detectado na amostra analisada, visto que esteve presente em 16 (61,53%) das 26 amostras positivas para a bactéria estudada. O genótipo *fimA* tipo IV foi detectado mais frequentemente associado ao genótipo *fimA* tipo II. Dentre os nove pares de familiares analisados, cinco apresentaram concordância quanto à presença ou ausência de *P. gingivalis*. Nos quatro pares que apresentaram presença de *P. gingivalis* (2 de pais e filhos e 2 de irmãos), também foi observado o genótipo *fimA* II.

Tabela 4– Distribuição dos genótipos *fimA* tipo II e tipo IV de *P. gingivalis* em 26 indivíduos com periodontite agressiva positivos para *P. gingivalis*

Genótipo de <i>P. gingivalis</i>	Nº de indivíduos n(%)
<i>fimA</i> II	11 (42%)
<i>fimA</i> IV	2 (8%)
<i>fimA</i> II/IV	5 (19%)
Nenhum dos genótipos analisados	8 (31%)
Total	26 (100%)

A distribuição dos genótipos *fimA* tipo II e tipo IV de *P. gingivalis* de acordo com a profundidade à sondagem (PS) dos sítios analisados está apresentada na tabela 5. O genótipo tipo II foi detectado em 81,81% dos sítios com $PS \geq 10$ mm. A ocorrência dos genótipos *fimA* tipo II e tipo IV foi maior em sítios com $PS \geq 7$ mm do que em sítios com PS entre 5-6 mm.

Tabela 5– Relação da distribuição dos genótipos *fimA* com a profundidade de sondagem (PS) em pacientes com periodontite

PS	n (%)	<i>fimA</i> II	<i>fimA</i> IV	<i>fimA</i> II e IV	Nenhuma das fímbrias estudadas
5-6mm	02 (8%)	1	1	-	-
7-9mm	13 (50%)	4	1	2	6
≥ 10mm	11 (42%)	6	-	3	2
Total	26 (100%)	11	2	5	8

5.1 Curva Padrão

A análise quantitativa das amostras dos pacientes foi realizada comparando-se os dados obtidos após o PCR em tempo real com os resultados de luminescência obtidos na curva padrão (dados obtidos com DNA molde das diluições de plasmídeos com quantidades padronizadas). Os dados de contagem correspondentes ao número de cópias de *P. gingivalis* e dos genes *fimA* por microlitro estão apresentados no apêndice C.

A curva padrão, com eficiência próxima a 100%, obtida após a reação de tempo real realizada apenas com as diluições de pTOPO16SPg está apresentada no apêndice D. Curvas semelhantes foram obtidas com os outros plasmídeos estudados. É importante ressaltar que a curva padrão foi realizada em todas as reações para o software comparar a luminescência e quantificar a amostra.

5.2 Análise da curva de dissociação

A quantificação foi baseada na luminescência gerada durante a formação dos amplicons. Durante a amplificação, o fluoróforo Sybr[®] Green se intercala na dupla fita liberando luz, significando que qualquer produto formado libera luz, inclusive dímeros de iniciadores. Para garantir a especificidade dos amplicons, após a reação, foi realizada a curva de dissociação.

As curvas de dissociação (APÊNDICES E e F), correspondentes à dissociação do produto de amplificação dos genes *fimA* II e IV, foram apresentadas na forma de gráficos obtidos no software StepOne^{TM10} v 2.1.

¹⁰ Applied Biosystems, Foster City, CA - EUA

6 DISCUSSÃO

A periodontite agressiva está associada a uma microbiota extremamente virulenta (MULLALLY *et al.*, 2000) e apresenta uma intensa agregação familiar (DE CARVALHO *et al.*, 2009; TONETTI; MOMBELLI, 1999; VAN DER VELDEN *et al.*, 1993). O periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é frequentemente detectado em pacientes com periodontite agressiva localizada, porém estudos sugerem que a forma generalizada da periodontite agressiva, que ocorre em indivíduos um pouco mais velhos e que afeta a maior parte da dentição, pode envolver uma microbiota diferente que inclui *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythensis* (anteriormente *Bacterioides forsythus*) (MULLALLY *et al.*, 2000; YANO-HIGUCHI *et al.*, 2000). Diante disso, este experimento teve como objetivo avaliar a presença de *P. gingivalis* e dos genótipos *fimA* tipo II e tipo IV em amostras de biofilme subgingival de indivíduos portadores de periodontite agressiva. Os resultados indicam a associação da presença de *P. gingivalis* com a ocorrência de periodontite agressiva generalizada, visto que 65% dos pacientes com esta doença (média de 31,4 anos) estavam positivos para essa bactéria.

Estudos realizados em diferentes países mostraram uma prevalência elevada de *P. gingivalis* em pacientes com quadro de periodontite agressiva (CORTELLI *et al.*, 2005; GAJARDO *et al.*, 2005; MISSAILIDIS *et al.*, 2004; TAKEUCHI *et al.*, 2003). No Brasil, Cortelli *et al.* (2005) e Missailidis *et al.* (2004) detectaram *P. gingivalis* em 80% e 86,7% dos pacientes com periodontite agressiva, respectivamente. No Chile, Gajardo *et al.* (2005) encontraram *P. gingivalis* em 88,8% dos indivíduos. No Japão, Takeuchi *et al.* (2003) relataram a ocorrência de *P. gingivalis* em 90% dos pacientes com quadro de periodontite agressiva localizada e em 82,5% dos pacientes com a forma generalizada. Miura *et al.* (2005) detectaram *P. gingivalis* em 178 (79,8%) das 223 amostras de biofilme subgingival de 18 pacientes japoneses (19-34 anos) com periodontite agressiva. Os resultados do presente estudo mostraram que 65% dos sítios dos pacientes (10-42 anos) com periodontite agressiva estavam colonizados por *P. gingivalis*, corroborando com o estudo de Yano-Higuchi *et al.* (2000) que identificaram *P. gingivalis* em 59,4% dos sítios dos pacientes japoneses (23-35 anos) com periodontite de progressão rápida. A menor prevalência de *P. gingivalis* encontrada no presente estudo pode ser

justificada pelo fato de ter sido avaliado apenas um sítio de cada indivíduo da amostra enquanto os estudos citados anteriormente analisaram múltiplos sítios por paciente.

Vários estudos descreveram a ocorrência de *P. gingivalis* em quadros de periodontite (AMANO *et al.*, 2000; BEIKLER *et al.*, 2003; MISSAILIDIS *et al.*, 2004). Beikler *et al.* (2003), em estudo realizado na Alemanha, relataram que 50,25% dos indivíduos caucasianos com periodontite agressiva ou crônica (moderada a severa) eram colonizados por *P. gingivalis*. Por outro lado, estudos realizados no Brasil por Missailidis *et al.* (2004) e no Japão por Amano *et al.* (2000) detectaram *P. gingivalis* em porcentagens mais elevadas, 89,4% e 87,1%, respectivamente. A variação na prevalência de *P. gingivalis* pode ser atribuída a diferenças na localização geográfica, idade dos participantes e condição periodontal da população estudada.

A prevalência de *P. gingivalis* na população pode variar em diferentes países ou regiões (CORTELLI *et al.*, 2005; MOMBELLI *et al.*, 2000). Haffajje e Socransky (2004) examinaram a composição da microbiota subgingival de indivíduos com periodontite crônica de quatro países. A proporção média de *P. gingivalis* entre pacientes com periodontite crônica foi mais baixa em suecos (1,6% da microbiota) e mais alta em chilenos (11,9%). Já em americanos e brasileiros, foram encontradas proporções de 6,6%, 7,5%, respectivamente. Os autores destacaram que a profundidade de sondagem não deve ser o único e nem o mais importante fator de controle do nível de colonização, uma vez que os indivíduos chilenos apresentaram uma média de profundidade de sondagem rasa e os indivíduos suecos uma média profunda. Também destacaram que outros fatores podem provocar diferenças na composição da microbiota subgingival, como: genética, dieta, cultura, cuidados com a saúde, hábitos de higiene bucal, condição sócio-econômica e acesso ao atendimento odontológico. No estudo acima citado, os indivíduos da América do Sul eram de grupos com baixa condição sócio-econômica com menos acesso ao atendimento odontológico do que os indivíduos suecos e americanos.

Hamlet *et al.* (2001) relataram que a prevalência de *P. gingivalis* aumenta de forma significativa com o aumento da profundidade à sondagem. Em estudo no Japão com pacientes com periodontite crônica generalizada e periodontite agressiva (localizada e generalizada), *P. gingivalis* foi detectada mais frequentemente em sítios de pacientes com periodontite agressiva localizada com perda de inserção severa (nível de inserção clínica ≥ 6 mm) (Takeuchi *et al.* 2003). Estes achados corroboram com os resultados do estudo de Missailidis *et al.* (2004) que detectaram *P. gingivalis* em 79,9% dos sítios com periodontite. Dentre os sítios com periodontite,

75,6% dos sítios com profundidade à sondagem rasa (4-6 mm), 86,6% dos sítios com profundidade à sondagem entre 7-9 mm e 75% dos sítios com profundidade à sondagem > 10 mm eram colonizados por *P. gingivalis*. Kawada *et al.* (2004) encontraram, através de análises quantitativas, uma correlação positiva entre o número de *P. gingivalis* e a profundidade da bolsa periodontal. Além disso, os autores enfatizaram que para cada 1 mm de aumento na profundidade à sondagem, o número de *P. gingivalis* aumenta 10 vezes. Teixeira *et al.* (2009) observaram níveis maiores de *P. gingivalis* em bolsas periodontais profundas (≥ 7 mm) do que em rasas ou intermediárias. Os resultados obtidos no presente experimento confirmam os dados acima, visto que 73,33% dos sítios com profundidade à sondagem ≥ 10 mm analisados estavam colonizados por *P. gingivalis*.

É imprescindível a realização de estudos que investiguem a distribuição e a prevalência dos genótipos de *P. gingivalis* em indivíduos com diferentes condições periodontais, visto que a diversidade fenotípica e genotípica de *P. gingivalis* pode resultar em diferenças na capacidade de induzir destruição periodontal (AMANO *et al.*, 2001; GRIFFEN *et al.*, 1999;). Cepas de *Porphyromonas gingivalis* com fímbria tipo II são mais virulentas que os outros tipos (INABA *et al.*, 2008) e são frequentemente detectadas em bolsas periodontais profundas (AMANO *et al.*, 1999). Vários estudos relataram uma maior prevalência do genótipo *fimA* tipo II em pacientes com periodontite (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000; BEIKLER *et al.*, 2003; MISSAILIDIS *et al.*, 2004; NAKAGAWA *et al.* 2002b). Além do genótipo II, Beikler *et al.* (2003) relataram a ocorrência dos genótipos I e IV em 25,5% e 18,6% dos pacientes com periodontite (crônica ou agressiva) colonizados por *P. gingivalis*, respectivamente. Em estudos realizados no Japão, os genótipos IV e Ib também foram amplamente associados ao quadro de periodontite (AMANO *et al.*, 1999; AMANO *et al.*, 2000; NAKAGAWA *et al.*, 2002b). Davila-Perez *et al.* (2007) relataram uma maior prevalência dos genótipos *fimA* tipo Ib e II nos pacientes com periodontite e dos genótipos I e III nos pacientes diabéticos (tipo II) com periodontite. Apesar da amostra ser composta de indivíduos com a mesma condição periodontal (periodontite), os estudos acima citados utilizaram diferentes classificações e parâmetros clínicos, diversas formas de coleta das amostras e pesquisaram diferentes tipos de *fimA*, podendo justificar as diferenças encontradas na distribuição dos genótipos.

No estudo de Missailidis *et al.* (2004), o genótipo *fimA* tipo II foi o mais prevalente em pacientes brasileiros com periodontite (47%). O segundo genótipo mais prevalente foi o tipo

Ib (24,4%), seguidos dos tipos III (6,7%), IV (5,2%) e I (4,4%). No presente estudo, o genótipo *fimA* tipo IV foi encontrado em 26,92% dos sítios positivos para *P. gingivalis*, porém mais frequentemente associado ao genótipo *fimA* II (19%), corroborando com o estudo de Teixeira *et al.* (2009) que relatou a presença do genótipo *fimA* tipo IV em todos os 20 brasileiros fumantes com periodontite crônica analisados. A associação *fimA* II e IV foi observada em 90% destes indivíduos e em 28,9% dos sítios. Variações na prevalência dos genótipos podem ser justificadas por diferenças na condição periodontal da população estudada e nas técnicas empregadas nos estudos. O estudo de Missailidis *et al.* (2004) utilizou a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional que detecta apenas a presença do microrganismo. Já as amostras do presente estudo e do estudo de Teixeira *et al.* (2009) foram avaliadas através do PCR em tempo real. Esta técnica, além de apresentar grande especificidade e sensibilidade, permite uma análise quantitativa dos patógenos.

Os genótipos *fimA* tipo II e IV de *P. gingivalis* também foram relacionados com o quadro de periodontite crônica (VAN DER PLOEG *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Em indivíduos com periodontite crônica da Noruega e Suíça, VAN DER PLOEG *et al.*, (2004) detectaram uma maior prevalência do genótipo *fimA* IV (73%), comparado com o *fimA* II (67%), corroborando com os resultados do estudo de Teixeira *et al.* (2009) com indivíduos brasileiros. Teixeira *et al.* (2009) correlacionaram os níveis dos genótipos *fimA* II e IV de *P. gingivalis* com a profundidade de sondagem em uma amostra de 20 indivíduos fumantes com periodontite crônica. Através da técnica do PCR em tempo real, 168 amostras de biofilme subgingival de sítios com diferentes profundidades de sondagem foram analisadas. De acordo com os resultados, *P. gingivalis* foi detectada em 152 (90,5%) dos 168 sítios analisados. Com relação à distribuição dos genótipos, *fimA* tipo IV foi detectado em 117 sítios (69,6%) e o tipo II em 47 sítios (28%). Estes achados corroboram com os dados obtidos por Griffen *et al.* (1999) que demonstraram que a cepa W83, correspondendo à fímbria tipo IV, foi mais associada aos casos de periodontite que as demais. Ao contrário dos estudos acima citados, Zhao *et al.* (2007) encontraram o genótipo *fimA* tipo II em maior porcentagem do que o genótipo IV.

Os resultados deste ensaio sugerem associação entre o genótipo *fimA* tipo II de *P. gingivalis* e o quadro de periodontite agressiva, visto que o genótipo *fimA* II foi detectado em 16 (61,53%) dos 26 indivíduos com periodontite agressiva positivos para *P. gingivalis*. De forma semelhante, Miura *et al.* (2005) relataram que o genótipo *fimA* II foi o mais prevalente, sendo

detectado em 46,7% dos indivíduos japoneses com periodontite agressiva. Os resultados mostraram ainda que o segundo genótipo mais prevalente foi o tipo Ib, seguido pelo tipo I. No presente estudo, 31% dos indivíduos positivos para *P. gingivalis* não apresentaram os genótipos estudados (tipos II e IV), sugerindo a presença de outros genótipos *fimA* não pesquisados, como os tipos Ib e I. Diferente do estudo acima citado, a presente pesquisa detectou o genótipo *fimA* IV na amostra estudada. Dos sete sítios que apresentaram o genótipo tipo IV, cinco apresentaram a associação *fimA* tipo IV e II. Amano *et al.* (2000) também observaram que, em casos de coexistência de vários tipos de *fimA*, um dos genótipos (tipo II ou IV) esteve presente em 93% das amostras de pacientes com periodontite positivos para *P. gingivalis*. De forma contrária, VAN DER PLOEG *et al.* (2004) relataram que, quantitativamente, *fimA* II predominou nos sítios periodontais multicolonizados, enquanto o genótipo *fimA* IV predominou somente em sítios negativos para o genótipo *fimA* II. Estes dados sugerem que os genótipos apresentam diferenças na capacidade de atingir altas contagens de células nos sítios periodontais, possivelmente devido a diferenças nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou à vantagem competitiva do genótipo *fimA* II. Contudo, deve ser ressaltado que o estudo piloto de VAN DER PLOEG *et al.* (2004) apresentou duas limitações: o pequeno número de pacientes testados e a análise de um *pool* de amostras de sítios distintos, dificultando a análise da coexistência de diferentes genótipos *fimA* no mesmo sítio.

Diferenças na distribuição dos diferentes genótipos *fimA* de acordo com os parâmetros clínicos foram observadas em alguns estudos (AMANO *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Os resultados do presente estudo mostraram que os genótipos *fimA* tipos II e IV foram mais frequentemente detectados em sítios com profundidade de sondagem (PS) ≥ 7 mm do que em sítios com PS entre 5-6 mm. Estes achados corroboram com o estudos de Amano *et al.* (1999) e Zhao *et al.* (2007) que destacaram a ocorrência dos genótipos *fimA* II e IV em bolsas periodontais profundas. Por outro lado, Teixeira *et al.* (2009) não observaram diferenças na prevalência dos genótipos *fimA* II e IV de acordo com a PS, porém os níveis de *fimA* IV aumentaram de forma significativa com o aumento da profundidade de sondagem. Diferente dos resultados do presente ensaio, Zhao *et al.* (2007), através da técnica de PCR convencional, observaram uma incidência menor do genótipo *fimA* tipo IV no grupo com profundidade à sondagem ≥ 7 mm do que no grupo com profundidade à sondagem de 4-6 mm. Estes resultados demonstram a existência de genótipos específicos relacionados com a progressão

da periodontite. Além disso, mostram a importância da análise dos sítios de acordo com os parâmetros clínicos e através de técnicas qualitativas. De acordo com alguns estudos (DOUNGUDOMDACHA *et al.*, 2001; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006), o aumento quantitativo de patógenos específicos parece ser importante para a iniciação e progressão das doenças periodontais.

A possibilidade de transmissão de *P. gingivalis* entre cônjuges e pelo contato com um membro da família infectado foi confirmada por alguns estudos (ASIKAINEN; CHEN; SLOTS, 1996; SAARELA *et al.*, 1993; TUIE-MCDONNELL *et al.*, 1997; VAN STEENBERGEN *et al.*, 1993). Asano *et al.* (2003) destacaram que o genótipo *fimA* II é um importante fator para a transmissão de *Porphyromonas gingivalis* entre cônjuges. Por outro lado, Asikainen, Chen e Slots (1996) relataram que *P. gingivalis* não foi transmitida de pais para filhos em nenhuma das famílias estudadas. Diante do forte componente familiar da periodontite agressiva e da possibilidade de transmissão de *P. gingivalis*, o presente ensaio englobou na amostra estudada 18 indivíduos com parentesco entre si, sendo 10 irmãos e 8 pai/mãe e filho. Dentre os nove pares de familiares, cinco apresentaram concordância quanto à presença ou ausência de *P. gingivalis*. Dos quatro pares (2 pares de pai/mãe e filhos e 2 pares de irmãos) que apresentaram *P. gingivalis*, também foi observado o genótipo *fimA* tipo II. Dos oito familiares positivos para *P. gingivalis*, dois tinham 20 anos e um tinha 10 anos. Lamell *et al.* (2000), em estudo longitudinal de 1 a 3 anos com crianças e adolescentes (2-20 anos), enfatizam que *P. gingivalis* é um patógeno que habita comumente a cavidade oral de crianças de qualquer idade e frequentemente colonizam o indivíduo de forma transitória, podendo tornar-se mais estável nos últimos anos da adolescência.

Este estudo destacou a presença de *P. gingivalis* em 65% dos pacientes com periodontite agressiva generalizada, exibindo uma maior porcentagem do genótipo *fimA* tipo II (42%) e da associação dos genótipos *fimA* tipos II e IV (19%). Visto que são escassos estudos com pacientes brasileiros com a doença periodontal agressiva generalizada, mais estudos se fazem necessários a fim de investigar a relação da associação dos genótipos *fimA* tipos II e IV com o processo etiopatogênico de destruição periodontal na periodontite agressiva generalizada.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste trabalho, é possível concluir que:

- há uma relação entre o genótipo *fimA* II de *Porphyromonas gingivalis* e a ocorrência deste microrganismo em indivíduos com periodontite agressiva generalizada;
- o genótipo *fimA* IV associado ao *fimA* II também pode fazer parte do processo etiopatogênico de destruição periodontal na periodontite agressiva generalizada.
- os genótipos *fimA* tipos II e IV foram mais frequentemente detectados em sítios com profundidade de sondagem ≥ 7 mm.

REFERÊNCIAS

- AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v. 25, n. 4, p. 229-235, 1975.
- AKIYAMA, S.; AMANO, A.; KATO, T.; TAKADA, Y.; KIMURA, K. R.; MORISAKI, I. Relationship of periodontal bacteria and *Porphyromonas gingivalis fimA* variations with phenytoin-induced gingival overgrowth. **Oral Dis.**, v. 12, n. 1, p. 51-56, Jan. 2006.
- AMANO, A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 1, p. 90-96, Jan. 2003.
- AMANO, A.; KISHIMA, T.; AKIYAMA, S.; NAKAGAWA, I.; HAMADA, S.; MORISAKI, I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 3, p. 368-373, Mar. 2001.
- AMANO, A.; KUBONIWA, M.; NAKAGAWA, I.; AKIYAMA, S.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and periodontal health status. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 9, p. 1664-1668, Sept. 2000.
- AMANO, A.; NAKAGAWA, I.; KATAOKA, K.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 5, p. 1426-1430, May. 1999.
- AMANO, A., NAKAGAWA, I.; OKAHASHI, N.; HAMADA, N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. **J. Periodontol. Res.**, v. 39, n. 2, p. 136-142, Apr. 2004.
- AMANO, A.; PREMARAJ, T.; KUBONIWA, M.; NAKAGAWA, I.; SHIZUKUIISHI, S.; MORISAKI, I.; HAMADA, S. Altered antigenicity in periodontitis patients and decreased adhesion of *Porphyromonas gingivalis* by environmental temperature stress. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 16, n. 2, p. 124-128, Apr. 2001.
- ASANO, H.; ISHIHARA, K.; NAKAGAWA, T.; YAMADA, S.; OKUDA, K. Relationship between transmission of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* type in spouses. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 9, p. 1355-1360, Sept. 2003.
- ASIKAINEN, S.; CHEN, C.; SLOTS, J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 11, n.6, p. 387-394, Dec. 1996.
- BEIKLER, T.; PETERS, U.; PRAJANEH, S.; PRIOR, K.; EHMKE, B.; FLEMMING, T. F. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in Caucasians. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 111, n. 5, p. 390-394, Oct. 2003.

BOUTAGA, K.; VAN WINKELHOFF, A. J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; SAVELKOUL, P. H. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 11, p. 4950-4954, Nov. 2003.

BRAGA, R. R.; CARVALHO, M. A.; BRUÑA-ROMERO, O.; TEIXEIRA, R. E.; COSTA, J. E.; MENDES, E. N.; FARIAS, L. M.; MAGALHÃES, P. P. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. **Anaerobe.**, v. 16, n. 3, p. 234-239, June 2010.

CASARIN, R. C.; RIBEIRO EDEL, P.; MARIANO, F. S.; NOCITI, F.H. Jr.; CASATI, M. Z.; GONÇALVES, R. B. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 45, n. 5, p. 635-642, Oct. 2010.

CORTELLI, J. R.; CORTELLI, S. C.; JORDAN, S.; HARASZTHY, V. I.; ZAMBON, J. J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, n. 8, p. 860-866, Aug. 2005.

DA SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; DO SOUTO, R. M.; LUIZ, R. R.; COLOMBO, A. P. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. **Arch Oral Biol.**, v. 56, n. 9, p. 899-906, Sept. 2011.

DARVEAU, R. P., TANNER, A.; PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 12-32, June 1997.

DAVILA-PEREZ, C.; AMANO, A.; ALPUCHE-SOLIS, A. G.; PATIÑO-MARIN, N.; PONTIGO-LOYOLA, A. P.; HAMADA, S.; LOYOLA-RODRIGUES, J. P. Distribution of genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in type 2 diabetic patients with periodontitis in Mexico. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 1, p. 25-30, jan. 2007.

DE CARVALHO, F. M.; TINOCO, E. M.; GOVIL, M.; MARAZITA, M. L.; VIEIRA, A. R. Aggressive periodontitis is likely influenced by a few small effect genes. **J Clin Periodontol.**, v. 36, n. 6, p. 468-473, June 2009.

DOUNGUDOMDACHA, S.; RAWLINSON, A.; WALSH, T. F.; DOUGLAS, C. W. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 5, p. 437-445, May. 2001.

FAVERI, M.; FIGUEIREDO, L. C.; DUARTE, P. M.; MESTNIK, M. J.; MAYER, M. P.; FERES, M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 9, p. 739-749, Sept. 2009.

- FUJISE, O.; MIURA, M.; HAMACHI, T.; MAEDA, K. Involvement of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotype in treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 10, p.1661-1666, Oct. 2005.
- GAJARDO, M.; SILVA, N.; GÓMEZ, L.; LEÓN, R.; PARRA, B.; CONTRERAS, A.; GAMONAL, J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 2, p. 289-294, Feb. 2005.
- GRIFFEN, A. L.; LYONS, S. R.; BECKER, M. R.; MOESCHBERGER, M. L.; LEYS, E. J. *Porphyromonas gingivalis* strain variability and periodontitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 12, p. 4028-4033, Dec. 1999.
- HAFFAJEE, A. D.; BOGREN, A.; HASTURK, H.; FERES, M.; LOPEZ, N. J.; SOCRANSKY, S. S. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, n. 11, p. 996-1002, Nov. 2004.
- HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol.** 2000, v. 5, p. 78-111, June 1994.
- HAMADA, S.; AMANO, A.; KIMURA, S.; NAKAGAWA, I.; KAWABATA, S.; MORISAKI, I. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 13, n. 3, p. 129-138, June 1998.
- HAMLET, S. M.; CULLINAN, M. P.; WESTERMAN, B.; LINDEMAN, M.; BIRD, P. S.; PALMER, J.; SEYMOUR, G. J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 12, p. 1163-1171, Dec. 2001.
- HANAZAWA, S.; MURAKAMI, Y.; HIROSI, K.; AMANO, S.; OHMORI, Y.; HIGUCHI, H.; KITANO, S. *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis fimbriae* activate mouse peritoneal macrophages and induce gene expression and production of interleukin-1. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 6, p.1972-1977, June 1991.
- HIRAMINE, H.; WATANABE, K.; HAMADA, N.; UMEMOTO, T. *Porphyromonas gingivalis* 67-kDa fimbriae induced cytokine production and osteoclast differentiation utilizing TLR2. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 229, n. 1, p. 49-55, Dec. 2003.
- HIROSE, K.; ISOGAI, E.; MIZUGAI, H.; MIURA, H.; UEDA, I. Inductive effect of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae on differentiation of human monocytic tumor cell line U937. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 11, n. 1, p. 62-4, Feb. 1996.
- HOLT, S. C.; KESAVALU, L.; WALKER, S.; GENCO, C. A. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol** 2000, v. 20, p. 168-238, June 1999.
- INABA, H.; NAKANO, K.; KATO, T.; NOMURA, R.; KAWAI, S.; KUBONIWA, M.; ISHIHARA, K.; OOSHIMA, T. AMANO, A. Heterogenic virulence and related factors among

clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, n. 1, p. 29-35, Feb. 2008.

KAWADA, M.; YOSHIDA, A.; SUZUKI, N.; NAKANO, Y.; SAITO, T.; OHO, T.; KOGA, T. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, n. 5, p. 289-292, Oct. 2004.

LAMELL, C. W.; GRIFFEN, A. L.; McCLELLAN, D. L.; LEYS, E. J. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1196-1199, Mar. 2000.

LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, n. 6, p. 341-349, Dec. 2000.

LAU, L.; SANZ, M.; HERRERA, D.; MORILLO, J. M.; MARTÍN, C.; SILVA, A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, n. 12, p. 1061-1069, Dec. 2004.

MISSAILIDIS, C. G.; UMEDA, J. E.; OTA-TSUZUKI, C.; ANZAI, D.; MAYER, M. P. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 224-229, Aug. 2004.

MIURA, M.; HAMACHI, T.; FUJISE, O.; MAEDA, K. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 40, n. 2, p. 147-152, Apr. 2005.

MOMBELLI, A.; SCHMID, B.; RUTAR, A.; LANG, N. P. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 1, p. 14-21, Jan. 2000.

MULLALLY, B. H.; DACE, B.; SHELBURNE, C. E.; WOLFF, L. F.; COULTER, W. A. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 35, n. 4, p. 232-241, Aug. 2000.

NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; KIMURA, R. K.; NAKAMURA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 5, p. 1909-1914, May 2000.

NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; KUBONIWA, M.; NAKAMURA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Functional differences among *FimA* variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. **Infect. Immunol.**, v. 70, n. 1, p. 277-285, Jan. 2002a.

NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; OHARA-NEMOTO, Y.; ENDOH, N.; MORISAKI, I.; KIMURA, S.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Identification of a new variant of *fimA* gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. **J. Periodontol. Res.**, v. 37, n.6, p. 425-432, Dec. 2002b.

NAKANO, K.; KUBONIWA, M.; NAKAGAWA, I.; YAMAMURA, T.; NOMURA, R.; OKAHASHI, N.; Comparison of inflammatory changes caused by *Porphyromonas gingivalis* with distinct *fimA* genotypes in a mouse abscess model. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, n. 3, p. 205-9, June 2004.

OGAWA, T.; UCHIDA, H.; HAMADA, S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and their synthetic peptides induce proinflammatory cytokines in human peripheral blood monocyte cultures. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 116, n. 2, p. 237-242, Feb. 1994.

SAARELA, M.; VON TROIL-LINDEN, B.; TORKKO, H.; STUCKI, A. M.; ALALUUSUA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; ASIKAINEN, S. Transmission of oral bacterial species between spouses. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 8, n. 6, p. 349-354, Dec. 1993.

SUGANO, N.; IKEDA, K.; OSHIKAWA, M.; SAWAMOTO, Y.; TANAKA, H.; ITO, K. Differential cytokine induction by two types of *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, n. 2, p. 121-123, Apr. 2004.

TAKEUCHI, Y.; UMEDA, M.; ISHIZUKA, M.; HUANG, Y.; ISHIKAWA, I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 10, p. 1460-1469, Oct. 2003.

TAMURA, K.; NAKANO, K.; NOMURA, R.; MIYAKE, S.; NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; OOSHIMA, T. Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in Japanese children and adolescents. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 5, p. 674-679, May 2005.

TEIXEIRA, S. R.; MATTARAZO, F.; FERES, M.; FIGUEIREDO, L. C.; DE FAVERI, M.; SIMIONATO, M. R.; MAYER, M. P. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 6, p. 482-487, June 2009.

TELES, R. P.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbiological goals of periodontal therapy. **Periodontol. 2000**, v. 42, p. 180-218, 2006.

TONETTI, M. S.; MOMBELLI, A. Early-onset periodontitis. **Ann. Periodontol.**, v. 4, n. 1, p. 39-53, Dec. 1999.

TORRUNGRUANG, K.; BANDHAYA, P.; LIKITTANASOMBAT, K.; GRITTAYAPHONG, C. Relationship between the presence of certain bacterial pathogens and periodontal status of urban Thai adults. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 1, p. 122-9, Jan. 2009.

TUITE-MCDONNELL, M.; GRIFFEN, A. L.; MOECHBERGER, M. L.; DALTON, R. E.; FUERST, P. A.; LEYS, E. J. Concordance of *Porphyromonas gingivalis* colonization in families. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 2, p. 455-461, Feb. 1997.

VAN DER PLOEG, J. R.; GIERTSEN, E.; LÜDIN, B.; MÖRGELI, C.; ZINKERNAGEL, A.S.; GMUR, R. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in dental plaque. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 232, n. 1, p. 31-37, Mar. 2004.

VAN DER VELDEN, U.; ABBAS, F.; ARMAND, S.; DE GRAAFF, J.; TIMMERMAN, M. F.; VAN DER WEIJDEN, G. A.; VAN WINKELHOFF, A. J.; WINKEL, E. G. The effect of sibling relationship on the periodontal condition. **J. Clin. Periodontol.**, v. 20, n. 9, p. 683-90, Oct. 1993.

VAN STEENBERGEN, T. J.; PETIT, M. D.; SCHOLTE, L. H.; VAN DER VELDEN, U.; DE GRAAFF, J. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. **J. Clin. Periodontol.**, v. 20, n. 5, p. 340-345, May 1993.

YANO-HIGUCHI, K.; TAKAMATSU, N.; HE, T.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I. Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, n. 8, p. 597-602, Aug. 2000.

ZAMBON, J. J. Periodontal diseases: microbial factors. **Ann. Periodontol.**, v. 1, n. 1, p. 879-925, Nov. 1996.

ZHAO, L.; WU, Y. F.; MENG, S.; YANG, H.; OUYANG, YL.; ZHOU, X. D. Prevalence of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in Chinese adults. **J. Periodontal Res.**, v. 42, n. 6, p. 511-517, Dec. 2007.

APÊNDICE A - Calibração

Foram realizados dois momentos de calibração, um antes do início do estudo e outro durante. Para tanto em cada momento seis pacientes apresentando quadro de periodontite crônica e agressiva foram submetidos a dois exames clínicos periodontais, em intervalo de três dias, sendo analisados a profundidade de sondagem e o nível de inserção clínico. Os dados estão dispostos na tabela abaixo:

Tabela 8 – Valores de correlação intraclassa de profundidade de sondagem (PS) e de nível de inserção clínico (NIC) entre os dois exames.

n	Dentes (média)	CCIC PS	CCIC NIC
6	20,8	0,80*	0,88*
6	20,5	0,86*	0,90*

**p < 0,0001*

CCIC- Coeficiente de correlação intraclassa

PS – Profundidade de sondagem

NIC – Nível de inserção clínico

APÊNDICE B – Protocolo para extração de DNA

- ✓ As amostras foram homogeneizadas em um agitador de tubos em máxima velocidade por 1 minuto.
- ✓ 200 µL foram transferidos para um novo tubo e centrifugados (10 min/12.000 rpm).
- ✓ Após removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 200 µL da matrix do InstaGene™¹¹ ao pellet, seguido por incubação à 56 °C por 30 min.
- ✓ Após, os tubos foram agitados por 10 seg. e incubados novamente por 8 min. a 100°C.
- ✓ Então os tubos foram agitados por 10 seg. e centrifugados (3min./12.000 rpm), obtendo-se um sobrenadante contendo o DNA extraído.

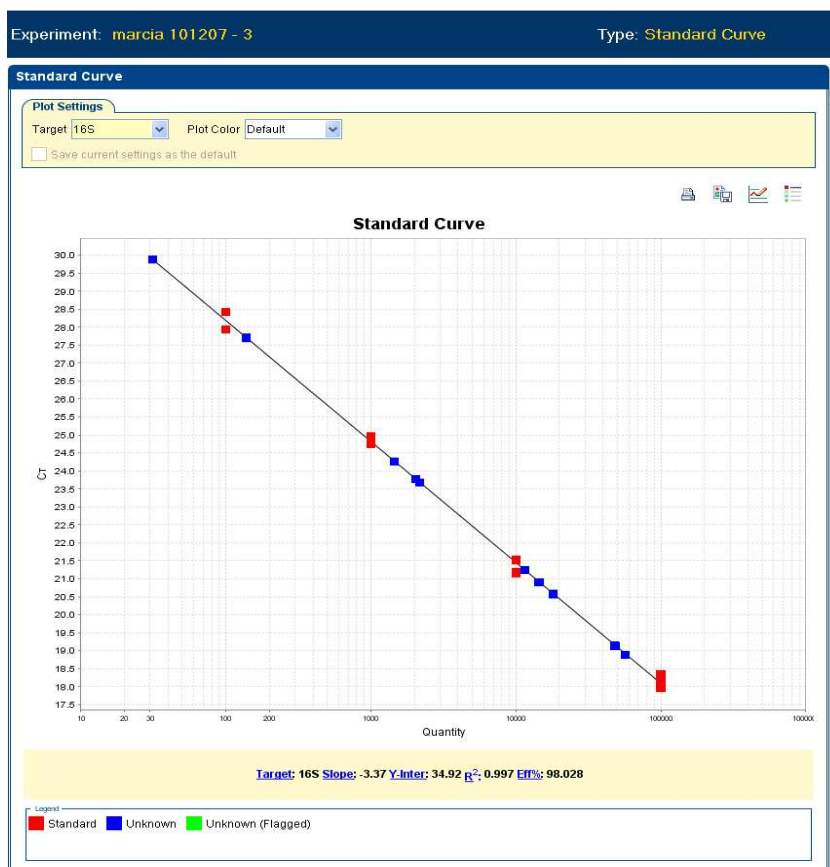
¹¹ BioRad Laboratories. Hercules, CA - USA

APÊNDICE C – Dados quantitativos de *P. gingivalis* e dos genótipos *fimA* II e IV

N° DO PACIENTE	IDADE	SEXO	N° DE DENTES	N° DE SÍTIOS	PS(mm)	NIC(mm)	Pg + (n° de cópias/µl)	<i>fimA</i> II (n° de cópias/µl)	<i>fimA</i> IV (n° de cópias/µl)
1	28	F	24	144	11	14			
8	22	M	28	168	11	13			
10	32	M	25	150	9	10			
12	16	F	26	156	6	6			
14	22	F	23	138	5	5	903,76		3,3650295
16	25	F	28	168	7	7			
17	42	F	26	156	13	15			
20	42	M	28	168	7	7	2408,8945		
22	38	F	20	120	10	11	3353,74925	288,61487	12,6754315
44	40	F	25	150	11	11	4978,416		
47	27	F	27	162	11	11	1230,59425	3353,614	11,3109295
49	36	F	25	150	8	10	196,71724	52,02067	
52	34	M	27	162	8	8	1231,6112	53,722187	
56	25	F	26	156	11	11			
58	29	F	28	168	7	7	1803,8385	1323,1166	8,0477475
62	25	M	27	162	8	8	964,20705		
63	31	M	26	156	9	10			
66	24	M	28	168	6	6			
67	36	F	26	156	10	10	3954,43235	232,286925	0,042754615
70	28	F	22	132	15	18	790,9633	452,1931	
71	32	F	23	138	10	11	1100,9066	380,809235	
73	35	M	26	156	9	9	791,446		
75	33	F	26	156	8	9	2087,8113		1,7568955
76	41	F	20	120	12	14	1263,56065	139,02285	

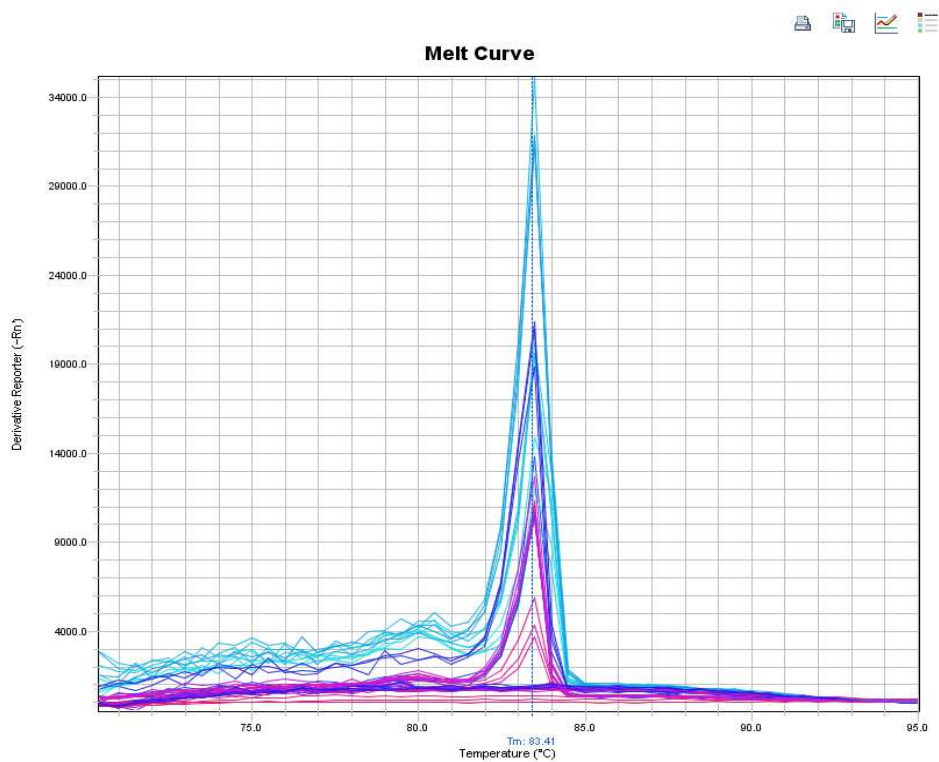
78	10	M	16	96	6	6	613,65435	125,3727	
79	20	M	28	168	7	5	7525,225	596,4572	2,27158785
82	35	F	28	168	9	11			
84	31	F	26	156	7	7			
85	31	F	23	138	10	11	944,69515	113,15458	
87	27	M	23	138	7	7	429,435335	11,637493	
89	37	M	21	126	14	15	601,8802	12,55354	
97	20	F	25	150	11	11	3187,8142	486,124175	
99	31	F	23	138	9	9	1405,32775		
102	17	M	27	162	6	6			
103	42	M	26	156	8	8	7728,3795	541,3769	
106	28	M	26	156	7	8	25595,25		
112	40	F	24	144	9	11	2840,429		
114	14	M	28	168	5	5			
120	28	F	26	156	10	10	25241,834		
122	33	F	22	132	7	7			

APÊNDICE D – Curva padrão



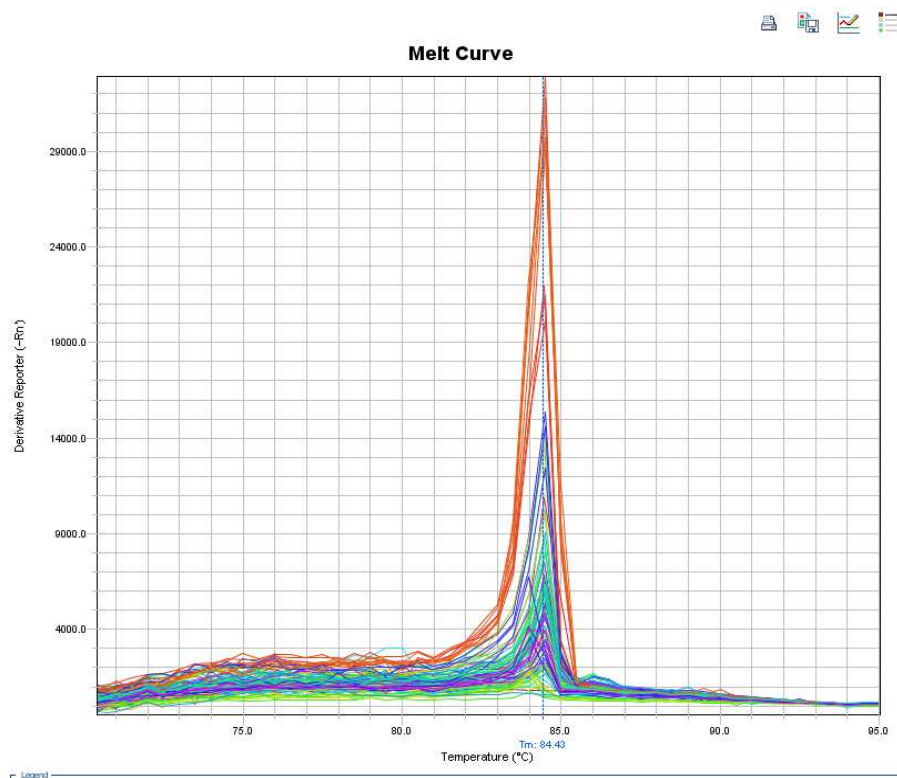
Curva Padrão obtida a partir de várias diluições de plasmídeos, abrigando o gene 16SrRNA.

APÊNDICE E – Curva de dissociação do gene *fimA* II

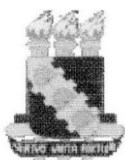


Curva de Dissociação obtida após reação de amplificação utilizando os iniciadores espécies específicos para o gene *fimA* II.

APÊNDICE F – Curva de dissociação do gene *fimA* IV.



Curva de Dissociação obtida após reação de amplificação utilizando os iniciadores espécies específicos para o gene *fimA* IV.

ANEXO A – Protocolo do Comitê de Ética

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 133/08

Fortaleza, 14 de março de 2008

Protocolo COMEPE nº 20/ 08

Pesquisador responsável: Virginia Régia Souza da Silveira

Deptº./Serviço: Departamento de Odontologia/ UFC

Título do Projeto: “Avaliação da presença de fatores de virulência de *aggreatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes portadores de periodontite agressiva e seus familiares”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 13 de março de 2008.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Mirian Parente Monteiro

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu, _____ brasileiro(a), nascido(a) em ___/___/___, portador do RG nº _____ residente à _____, na cidade de _____, responsável por _____ brasileiro(a), nascido(a) em ___/___/___, portador do RG nº _____ residente à _____, na cidade de _____, concordo com a minha participação voluntária ou do menor acima, na pesquisa intitulada **”Avaliação da presença de fatores de virulência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes portadores de periodontite agressiva e seus familiares”** e declaro que fui informado e entendi, sem dúvida alguma, sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- 1- Fui esclarecido que esta pesquisa tem como objetivo analisar a presença de bactérias que causam doença em gengiva e osso. Para tanto, serei submetido a um exame clínico odontológico para verificar se possuo essa doença e para coletar uma quantidade de placa bacteriana subgengival de algumas áreas dentárias, com cones de papel absorvente. Procedimentos que podem causar certo desconforto, mas não prejudiciais à minha saúde.
- 2- Fui esclarecido que a realização da pesquisa não implica em risco algum para os participantes, pois o exame clínico a que serei submetido é um exame odontológico realizado com instrumentos devidamente esterilizados.

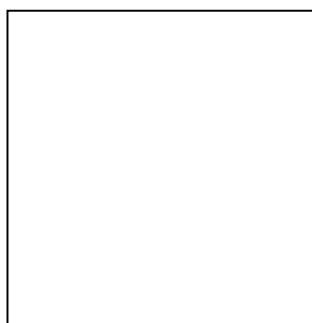
Telefones e endereço para qualquer esclarecimento:
 Virginia Régia Souza da Silveira: (85) 3217-1392/9995-0066
 FFOE-UFC / Rua Monsenhor Furtado s/n
 Comitê de Ética FMUFC: (85) 3366 8338

- 3- Apresenta como benefícios a detecção de doença periodontal e o encaminhamento para tratamento, se for detectada doença, para a clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem.
- 4- Estou ciente de que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas a esta e que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização ou prejuízo no atendimento clínico.
- 5- Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; porém será garantido o sigilo de identidade, assegurando a privacidade.
- 6- Estou ciente que a participação na pesquisa não acarretará em nenhum gasto, a não ser aqueles de deslocamento até a Faculdade, uma vez que todo material utilizado será fornecido pelo pesquisador.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Fortaleza, ____ de _____ de ____.

Consentimento do paciente (ou de seu responsável, caso menor)



Consentimento do paciente menor de 18 anos

Virgínia Régia Souza da Silveira
Pesquisador responsável