

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

**VIRGÍNIA RÉGIA SOUZA DA SILVEIRA**

**DETECÇÃO DE LEUCOTOXINA DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EM  
PORTADORES DE PERIODONTITE AGRESSIVA E SEUS FAMILIARES**

**FORTALEZA**

**2010**

**VIRGÍNIA RÉGIA SOUZA DA SILVEIRA**

**DETECÇÃO DE LEUCOTOXINA DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EM  
PORTADORES DE PERIODONTITE AGRESSIVA E SEUS FAMILIARES**

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

2010

S591d Silveira, Virgínia Régia Souza da  
Detecção de leucotoxina de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em portadores de periodontite agressiva e seus familiares/ Virgínia Régia Souza da Silveira. – Fortaleza, 2010.  
60 f. : il.

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

1. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. 2. Biologia Molecular. 3. Periodontite I. Rêgo, Rodrigo Otávio Citó César (orient.). II. Título.

CDD:617.63

**VIRGÍNIA RÉGIA SOUZA DA SILVEIRA**

**DETECÇÃO DE LEUCOTOXINA DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EM  
PORTADORES DE PERIODONTITE AGRESSIVA E SEUS FAMILIARES**

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Denise Madalena Palomari Spolidorio  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nádia Accioly Pinto Nogueira  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico este trabalho

aos meus pais, Raimundo e Lourdinha, pelos exemplos de ética e dignidade que sempre nortearam minha formação.

Ao companheiro Fernandes, por me compreender e ajudar na execução de mais este sonho e projeto de vida.

Aos meus filhos João Vítor e Pedro Vítor, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência e naqueles em que, apesar de presente, estive ausente.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo por ter acreditado e confiado em mim, pelos exemplos de calma, paciência, autocontrole e uma enorme capacidade de transmitir conhecimentos. Aprendi muito com o Sr., que mais uma vez me surpreendeu!

Aos pacientes que participaram desta pesquisa, sempre dispostos a ajudar no que pudessem e por acreditarem em mim e neste trabalho.

Às atendentes Ana Cristina e Rosilane, que sempre estiveram prontas para me ajudar e muito cooperaram na execução dos exames.

Aos colegas de mestrado Kátia, Márcia Bessa e, mais recentemente, o Gustavo, que sempre me estimularam e ajudaram no que puderam.

Aos colegas da turma de mestrado Ana Patrícia, Isabela, Alrieta, Daniele, Denise, Regina, André, Luciano, Jorgeana, Gabriela, Françoise, Mirela, Patrícia, Marília e George. Vocês foram mais que simples colegas.

Aos funcionários da secretaria do PPGO Lúcia Ribeiro e Germano Mahlmann Muniz, por estarem sempre dispostos em ajudar.

Às minhas irmãs Márcia e Socorro e aos meus cunhados Eliézio e Ribeiro, pelo estímulo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em especial à Dr.<sup>a</sup> Cristiane Roriz e ao Dr. Sérgio Lima Santiago, que sempre me estimularam em mais esta etapa da minha vida.

Aos professores doutores Ricardo Martins e Mônica Studart, pela cooperação e disponibilização da Clínica de Periodontia desta instituição para atendimento dos pacientes.

Às atendentes Odete e Marlene, da Clínica de Periodontia desta Faculdade, pela ajuda no atendimento dos pacientes.

À professora Dr.<sup>a</sup>. Márcia Mayer pela concessão dos microrganismos utilizados como controles positivos neste estudo.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

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.

“Comecei a descobrir que esperar é uma arte, que esperando se conseguem coisas. Esperar pode ser muito, muito poderoso. O tempo é uma coisa valiosa. Se você puder esperar dois anos, às vezes consegue algo que não conseguiria hoje, não importa o quanto venha a investir nisso, nem quantas vezes venha a bater com a cabeça na parede.”

(Dennis Wholey)



## RESUMO

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é um patógeno intensamente relacionado com a etiologia da periodontite agressiva. O objetivo deste estudo foi avaliar, via reação em cadeia da polimerase, a presença de clones de *A. actinomycetemcomitans* que exibem alta ou mínima leucotoxicidade em indivíduos portadores de periodontite agressiva (PAG) e em seus membros familiares (FAM). Trinta e cinco indivíduos com PAG ( $33,9 \pm 7,1$  anos), 33 FAM ( $22,8 \pm 11,4$  anos) e 41 portadores de periodontite crônica (PC) ( $44,1 \pm 9,4$  anos) foram analisados clinicamente pelo índice de placa (IP), índice gengival (IG), profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção clínico (NIC). Amostras de biofilme subgengival foram coletadas de todos os indivíduos do sítio interproximal com maior PS e maior NIC e analisadas microbiologicamente por meio de PCR, quanto à presença de *A. actinomycetemcomitans* e de seus clones leucotóxicos. Médias de PS e NIC desses sítios foram: PAG – 9,8 mm e 10,7 mm, FAM – 5,3 mm e 4,6 mm e PC – 8,2 mm e 9,4 mm, tendo sido observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. A presença de *A. actinomycetemcomitans* foi observada em 23 (51,1%) portadores de periodontite agressiva e em 16 (30,1%) portadores de periodontite crônica. Dentre eles, 37 (94,8%) exibiram clones de mínima leucotoxicidade e 2 (5,1%) clones de alta leucotoxicidade, um do grupo PAG e outro do grupo FAM, também com doença agressiva. Quanto à condição periodontal do grupo FAM, 30,3% apresentaram periodontite agressiva, 36,3% periodontite crônica e 33,3% estavam periodontalmente saudáveis ou mostravam gengivite. Dentre eles, 12,2% estavam positivos para a presença de *A. actinomycetemcomitans*. Maiores valores de PS e NIC foram observados nos pacientes com periodontite agressiva positivos para *A. actinomycetemcomitans* quando comparados àqueles pacientes negativos, com diferença estatisticamente significativa. A presença de *A. actinomycetemcomitans* foi associada à condição clínica de periodontite agressiva (*odds ratio*=3,1; intervalo de confiança: 1,4-7,0;  $p=0,009$ ). A maioria destes indivíduos exibiu uma forma generalizada de doença e estavam positivos para clones de mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans*. Os familiares externaram em sua maioria algum tipo de doença periodontal crônica ou agressiva.

Palavras-chave: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Biologia Molecular. Periodontite.

## ABSTRACT

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is a pathogen strongly associated with the etiology of aggressive periodontitis. The purpose of this study was to evaluate by polymerase chain reaction (PCR) the presence of highly and minimally leukotoxic clones of *A. actinomycetemcomitans* in patients with aggressive periodontitis (AgP) and their family members (FM). Thirty five patients with AgP ( $33,9 \pm 7,1$  years), 33 FM ( $22,8 \pm 11,4$  years) and 41 patients with chronic periodontitis (CP) ( $44,1 \pm 9,4$  years) were clinical analyzed through plaque index (PI), gingival index (GI), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL). Subgingival biofilm samples were collected from the interproximal periodontal sites ( $> PD$  and  $> CAL$ ) of each patient and their microbiological analysis were taken by PCR, concerning *A. actinomycetemcomitans* was observed and its leukotoxic clones. The PD and CAL average of this sites were: AgP – 9,8 mm e 10,7 mm, FM – 5,3 mm e 4,6 mm e CP – 8,2 mm e 9,4 mm. Statistically significant difference was observed among the groups. The presence of *A. actinomycetemcomitans* was observed in 23 (51,1%) patients with aggressive periodontitis and in others ones, 16 (30,1%) with chronic periodontitis. Among them 37 (94,8%) showed minimally leukotoxic clones and 2 (5,1%) highly leukotoxic clone, one was AgP group, the other was FM group, also with aggressive disease. Concerning to periodontal status of the FM group, 30,3% had aggressive periodontitis, 36,3% chronic periodontitis and 33,3% were periodontally normal or had gingivitis. Among them 12,2% were *A. actinomycetemcomitans* positive. The higher values of PD and CAL were observed in aggressive periodontitis patients that were *A. actinomycetemcomitans* positive when compared with *A. actinomycetemcomitans* negative patients ( $p < 0,05$ ). The presence of *A. actinomycetemcomitans* was correlated with aggressive periodontitis clinical status (*Odds ratio*=3,1; CI: 1,4-7,0;  $p=0,009$ ). The majority of the patients with aggressive periodontitis exhibited a generalized form of disease and were positives to minimally leukotoxic *A. actinomycetemcomitans* clones. The family members had any type of chronic or aggressive periodontal disease.

Key words: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Molecular Biology. Periodontitis.

## SUMÁRIO

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>            | <b>11</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b> | <b>13</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>             | <b>31</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>    | <b>32</b> |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>            | <b>39</b> |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>             | <b>46</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>             | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>             | <b>51</b> |
| <b>APÊNDICES.....</b>               | <b>56</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                  | <b>58</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é um cocobacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, que tem como nicho primário a cavidade oral. Este microorganismo é intensivamente relacionado com periodontite agressiva, em virtude de sua alta prevalência em indivíduos que apresentam esta doença (HAUBEK *et al.*, 1996; HARASZTHY *et al.*, 2000). Apesar de ser considerado periodontopatógeno, pode ser frequentemente detectado em indivíduos periodontalmente saudáveis, sugerindo que nem todos são igualmente susceptíveis ou que existe uma variação no fator de virulência deste microorganismo (MOMBELLI *et al.*, 1999).

Toxinas microbianas desempenham papel patogênico expressivo em muitas infecções. *A. actinomycetemcomitans* produz inúmeros fatores de virulência que podem estar envolvidos na destruição dos tecidos periodontais, dentre eles podendo se destacar uma variedade de toxinas, incluindo uma leucotoxina, com propriedade biológica única, pertencente a uma família de citolisinas bacterianas (LALLY *et al.*, 1989), que destrói especificamente os leucócitos polimorfonucleares humanos (PMN). Assim, essa leucotoxina contribui para o desenvolvimento da doença periodontal em humanos, principalmente em pacientes jovens (ZAMBON, 1985).

Métodos de detecção de variabilidade genética dos microrganismos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a análise mediante sondas de DNA (ZAMBON; HARASZTHY, 1995), possibilitaram observar diferenças genéticas na região promotora da leucotoxina entre cepas de *A. actinomycetemcomitans*, que estão diretamente correlacionadas com a leucotoxicidade das mesmas. As que apresentam alta leucotoxicidade possuem supressão de 530 pares de base na região promotora da leucotoxina enquanto as cepas de mínima leucotoxicidade não apresentam essa supressão. Assim aquelas altamente leucotóxicas (clone JP2) podem produzir de dez a 20 vezes mais leucotoxina do que as outras, o que lhes confere um potencial de interferir com a defesa imune inata do hospedeiro (BROGAN *et al.*, 1994). Alguns estudos demonstram que indivíduos exibindo clone de alta leucotoxicidade apresentam maior risco de desenvolvimento de periodontite agressiva (HAUBEK *et al.*, 1996; HAUBEK *et al.*, 1997; BUENO; MAYER; DIRIENZO, 1998; HARASZTHY *et al.*, 2000) e maior progressão de perda de inserção clínica (HAUBEK *et al.*, 2002; HAUBEK; WESTERGAARD, 2004; HAUBEK; POUSEN; KILIAN, 2007; HAUBEK *et al.*, 2008). A maioria destes estudos, entretanto, avaliou periodontite agressiva localizada,

sendo escassos dados sobre periodontite agressiva generalizada (CONTRERAS *et al.*, 2000; HARASZTHY *et al.*, 2000; HAUBEK *et al.*, 2001; HAUBEK *et al.*, 2004).

A transmissão de *A. actinomycetemcomitans* é estudada por vários autores (PREUS *et al.*, 1994; ASIKAINEN; CHEN; SLOTS, 1996; TINOCO; SIVAKUMAR; PREUS, 1998; REGO *et al.*, 2007), que demonstram que este microrganismo pode ser transmitido entre membros de uma mesma família. Além de uma predisponibilidade genética em relação à resposta inflamatória, a transmissão de *A. actinomycetemcomitans* pode ser apontada como hipótese para justificar a agregação familiar de indivíduos portadores de periodontite agressiva. Pacientes identificados com a presença do clone JP2 são oriundos de famílias onde havia pelo menos um indivíduo que também exibia histórico da doença (HAUBEK *et al.*, 1996; HAUBEK *et al.*, 1997; TINOCO *et al.*, 1997; HARASZTHY *et al.*, 2000; HAUBEK; WESTERGAARD, 2004).

Periodontite agressiva mostra alguma predisposição racial, sendo mais comum em indivíduos de origem africana (HAUBEK *et al.*, 1996; HAUBEK *et al.*, 1997; CONTRERAS *et al.*, 2000), sugerindo que esta doença possa estar associada com a disseminação do clone JP2 de *A. actinomycetemconitans* em indivíduos de origem africana (MOMBELLI *et al.*, 1999). Estudos revelam que no Brasil a cor das pessoas não está diretamente relacionada a sua ancestralidade genômica (PARRA *et al.*, 2003; PIMENTA *et al.*, 2006), sendo difícil estabelecer se nessa população existe uma predileção de qualquer doença ou microrganismo relacionado a uma raça específica, em razão da grande heterogeneidade. Os indivíduos que este estudo pretende avaliar são do Estado do Ceará, principalmente da cidade de Fortaleza. Esta população é basicamente mestiça e composta por uma miscigenação de brancos descendentes de europeus, negros e índios, sem predominância evidente de nenhuma das raças isoladamente (IBGE, 2007). Dessa forma, justifica-se a relevância de se avaliar o perfil clínico periodontal e microbiológico dos indivíduos portadores de periodontite agressiva nesta população.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### Seleção dos Estudos

Para a seleção dos artigos utilizados nesta revisão, foi realizada uma busca nas bases bibliográficas *PubMed* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)), utilizando os seguintes descritores: “periodontite agressiva”, “*Aggregatibacter (actinobacillus) actinomycetemcomitans*” e “leucotoxina”, devidamente traduzidos para a língua inglesa. Os descritores foram utilizados isoladamente ou em combinações.

Nesta revisão, foram incluídos cinco estudos do tipo *in vitro* (BAEHNI *et al.*, 1981; LALLY *et al.*, 1989; BROGAN *et al.*, 1994; JOHANSSON; HANSTRON; KALFAS, 2000; HAUBEK; POUSEN; KILIAN, 2007) encontrados no quadro 1. Alguns destes permitiram melhor definição do papel virulento das cepas de mínima e alta leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans*, bem como o papel das leucotoxinas sobre o periodonto e suas consequências na doença periodontal, principalmente na periodontite agressiva. No quadro 2, são abordados estudos do tipo transversais ou caso-controle (HAUBEK *et al.*, 1995; HAUBEK *et al.*, 1996; HAUBEK *et al.*, 1997; TINOCO *et al.*, 1997; MOMBELLI *et al.*, 1999; CONTRERAS *et al.*, 2000; HARASZTHY *et al.*, 2000; HAUBEK *et al.*, 2001; HAUBEK *et al.*, 2002; CORTELLI *et al.*, 2003) que procuraram verificar a presença de clones de *A. actinomycetemcomitans*, os quais apresentam alta ou mínima leucotoxicidade em determinados grupos e formas de doença periodontal. Também são mostrados estudos longitudinais (BUENO; MAYER; DIRIENZO, 1998; HAUBEK *et al.*, 2004; HAUBEK *et al.*, 2008; CORTELLI *et al.*, 2009; HAUBEK *et al.*, 2009; HÖGLUND *et al.*, 2009) que procuraram relacionar a infecção por estes clones com a evolução da periodontite agressiva e dos parâmetros clínicos periodontais. Os estudos estão dispostos nos quadros por ordem cronológica de publicação, para que se possa entender sua evolução e de seus achados.

Quadro 1 – Estudos *in vitro* que mostraram características das cepas de alta e mínima leucotoxicidade de *A.actinomycetemcomitans*

| AUTOR<br>(ANO)                 | AMOSTRA  | MÉTODO  | PRINCIPAIS ACHADOS   |
|--------------------------------|--|---|--|
| Baehni <i>et al.</i><br>(1981) | Cepas de <i>A.a</i> da coleção americana e de sítios de pacientes com periodontite | Cultura<br>Imunização em coelhos<br>Imuno-histoquímica                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aa</i> produz leucotoxina que destrói leucócitos polimorfonucleares humanos e de grandes primatas. As cepas não leucotóxicas de <i>Aa</i> não matam leucócitos polimorfonucleares humanos.</li> <li>- Cepas de <i>Aa</i> produtoras de leucotoxina e não produtoras podem estar em um mesmo sítio periodontal e sua proporção varia de acordo com o estado periodontal.</li> <li>- Em indivíduos saudáveis somente 7% do número de <i>Aa</i> são de cepas leucotóxicas e em indivíduos periodontalmente doentes cerca de 43-75% são de cepas leucotóxicas.</li> <li>- As propriedades leucotóxicas do <i>Aa</i> podem ser moduladas pelo soro humano e neutralizadas pelo soro de pacientes com periodontite juvenil e de coelhos anti-<i>Aa</i>.</li> <li>- Leucotoxina derivada do <i>Aa</i> pode ser um vetor na periodontite juvenil.</li> </ul> |
| Lally <i>et al.</i><br>(1989)  | Cepas JP2 de <i>Aa</i> .   | Cultura<br>Southern Blot<br>Eletroforese em gel<br>Sequenciamento do DNA  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Leucotoxina do <i>Aa</i> pertence a uma família de citolisinas bacterianas, com mecanismos de morte celular semelhante, mas com especificidade na célula-alvo.</li> <li>- Essa leucotoxina possui propriedades singulares, é codificada por um complexo de quatro genes: <i>ltxA</i>, <i>ltxB</i>, <i>ltxC</i> e <i>ltxD</i>.</li> </ul>  |
| Brogan <i>et al.</i><br>(1994) | Cepas de <i>Aa</i> (JP2, 652, Y4, NCTC 9710, HK 890, HL 905, HK910)                | Cultura<br>PCR<br>Southern Blot<br>Northern Blot<br>Sequenciamento do DNA | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sequência de nucleotídeos é similar entre as cepas de alta e mínima leucotoxicidade.</li> <li>- Cepas de <i>Aa</i> de mínima leucotoxicidade apresentam 530 pares de base na região promotora da leucotoxina que não está presente em cepas de alta leucotoxicidade (JP2).</li> <li>- Cepas JP2 produzem de dez a 20 vezes mais leucotoxina do que cepas de mínima leucotoxicidade.</li> </ul>  |

Quadro 1 – Estudos *in vitro* que mostraram características das cepas de alta e mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans*

| AUTOR<br>(ANO)                            | AMOSTRA   | MÉTODO                                | PRINCIPAIS ACHADOS  |
|---|---|---------------------------------------|---|
| Haubek,<br>Poulsen e<br>Kilian (2007)     | 82 cepas de <i>Aa</i> :<br>66 cepas com<br>supressão do<br>par da base 530<br>do gene da<br>leucotoxina e<br>16 cepas sem<br>essa supressão | PCR<br>DNA “Finger-<br>print”<br>PFGE | - Padrão de mutação do clone JP2 indica que este surgiu inicialmente como um genótipo distinto na parte mediterrânea da África, há aproximadamente 2400 anos atrás e se espalhou para o oeste da África, sendo transmitido para a América durante o comércio transatlântico de escravos.<br>- Colonização de membros de uma mesma família por cepa de clone JP2 com único ponto de mutação sugere forte evidência que há transmissão intrafamiliar e que a disseminação do clone JP2 está restrita a contatos próximos. |
| Johansson,<br>Hanstrom e<br>Kalfas (2000) | 55 cepas de 45<br>espécies<br>bacterianas da<br>flora<br>subgingival<br>Cepa de <i>Aa</i> de<br>alta<br>leucotoxicidade<br>HK 1519          | Cultura<br>Cromatografia              | - A microbiota periodontal subgingival pode modificar a virulência do <i>Aa</i> por meio da destruição de sua leucotoxina.<br>- Algumas espécies bacterianas que colonizam as bolsas periodontais podem degradar a leucotoxina do <i>Aa</i> .<br>- <i>P. gingivalis</i> exibiu a mais forte inibição à leucotoxicidade do <i>Aa</i> , seguida pelas cepas de <i>P. intermedia</i> e <i>P. nigrescens</i> .  |

*Aa*- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

PS- profundidade de sondagem

*P. intermedia* – *Prevotella intermedia*

Fonte: Elaboração própria, com base nos autores da 1ª coluna

PCR- reação em cadeia da polimerase

PJL- periodontite juvenil localizada

*P. nigrescens*- *Prevotella nigrescens*

PFGE- eletroforese em campo pulsado

*P. gingivalis*- *Porphyromonas gingivalis*



Quadro 2– Estudos transversais e longitudinais que mostraram a relação de *A. actinomycetemcomitans* com a doença periodontal

| AUTOR (ANO)                 | AMOSTRA   | CONDIÇÃO PERIODONTAL <sup>1</sup>  | TIPO DE ESTUDO | TEMPO DE OBSERVAÇÃO | MÉTODO  | PRINCIPAIS ACHADOS   |
|-----------------------------|---|--|----------------|---------------------|---|--|
| Haubek <i>et al.</i> (1995) | Biofilme de 88 indivíduos norte-europeus  | Periodontite do adulto e juvenil localizada sem tratamento prévio, gengivite leve e saudáveis                                    | Transversal    | _____               | Cultura<br>Southern<br>Blot   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Encontrados cinco sorotipos diferentes de <i>Aa</i></li> <li>- Amostras de 81 pacientes positivos para <i>Aa</i> apresentavam único sorotipo.</li> <li>- Sete indivíduos colonizados com dois sorotipos</li> <li>- Nenhuma cepa com supressão dos 530 pares de base.</li> </ul>   |
| Haubek <i>et al.</i> (1996) | Biofilme subgengival de 17 indivíduos   | Periodontite juvenil   | Transversal    | -----               | PCR<br>Cultura  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cepas com características de supressão dos 530 pares de base da região promotora da leucotoxina, isoladas de 11 indivíduos (12-21 anos) com familiares provenientes de Cabo-Verde, Marrocos e Nigéria.</li> <li>- Dos seis indivíduos restantes, dois cultivados com <i>Aa</i> com região promotora da leucotoxina completa.</li> <li>- Clone de <i>Aa</i>, caracterizado pela supressão dos 530 pares de base, pertence a tipo clonal único, sorotipo b, que resulta em aumento da produção de leucotoxina.</li> </ul> |
| Haubek <i>et al.</i> (1997) | 326 amostras de biofilme subgengival de indivíduos <i>Aa</i> positivos (47 Asiáticos, 171 Europeus, 32 Africanos, 44 Sul-americanos, 32 Americanos) | Saudáveis, periodontite juvenil localizada, periodontite do adulto, periodontite de rápida progressão e periodontite pré-puberal | Transversal    | _____               | Cultura<br>PCR<br>Southern<br>Blot<br>Sequencia-<br>mento do<br>DNA<br>Eletrofore-<br>se enzimáti<br>ca | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 38 isolados, todos pertencentes ao mesmo clone, apresentaram supressão dos 530 pares de base e pertenciam ao sorotipo b.</li> <li>- Este clone esteve associado com periodontite juvenil localizada em adolescentes de origem africana ou descendentes africanos.</li> <li>- Não foi encontrada nenhuma associação significativa entre algum sorotipo e doença periodontal.</li> </ul>  |

Quadro 2– Estudos transversais e longitudinais que mostraram a relação de *A. actinomycetemcomitans* com a doença periodontal

| AUTOR (ANO)                    | AMOSTRA  | CONDIÇÃO PERIODONTAL <sup>1</sup>   | TIPO DE ESTUDO | TEMPO DE OBSERVAÇÃO | MÉTODOS  | PRINCIPAIS ACHADOS   |
|--------------------------------|--|---|----------------|---------------------|--|--|
| Tinoco <i>et al.</i> (1997)    | Cepas de <i>Aa</i> de 36 indivíduos brasileiros (12–63 anos) oriundos de 15 famílias   | Saudáveis, gengivite de leve a moderada, periodontite juvenil localizada e do adulto ( $\geq 2$ sítios com PS $\geq 5$ mm e perda óssea radiográfica $> 2$ mm). | Transversal    | —                   | Imunofluorescência<br>Cultura<br>Dot blot<br>PCR       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sorotipos a, b e c ocorreram em todos os indivíduos.</li> <li>- Sorotipo c encontrado mais frequentemente em pacientes com periodontite juvenil localizada (PJJ) e periodontite do adulto do que sorotipo b.</li> <li>- Cepas de <i>Aa</i> de cinco indivíduos (14%) mostraram supressão dos 530 pares de base e sorotipo b (três indivíduos com PJJ e dois saudáveis). Todos provenientes de famílias onde havia ao menos um indivíduo com PJJ.</li> </ul>   |
| Bueno, Mayer e Dirienzo (1998) | Grupo-teste: biofilme de 24 indivíduos com idade $\leq 13$ anos, oriundos de 21 famílias afro-americanas com história de PJJ<br>Grupo-controle: 34 indivíduos, oriundos de famílias afro-americanas sem histórico de PJJ | Ausência de sinais clínicos de PJJ  | Longitudinal   | seis anos           | Cultura<br>Hibridização do DNA<br>PCR<br>Southern Blot | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nove indivíduos do grupo-teste e três do controle desenvolveram PJJ.</li> <li>- Oito indivíduos do grupo-teste e nenhum do grupo-controle apresentaram <i>Aa</i> com supressão na região que promove a leucotoxina; seis destes oito indivíduos do grupo-teste desenvolveram PJJ.</li> <li>- Nenhuma associação entre a presença de <i>Aa</i> e predisposição à PJJ.</li> <li>- Indivíduos apresentando <i>Aa</i> com supressão de pares de base na região que promove a leucotoxina, indicativo do genótipo que produz altos níveis de leucotoxina, apresentaram maior risco de desenvolver PJJ (<i>odds ratio</i> = 22.5).</li> </ul> |

Quadro 2– Estudos transversais e longitudinais que mostraram a relação de *A. actinomycetemcomitans* com a doença periodontal

| AUTOR (ANO)                    | AMOSTRA   | CONDIÇÃO PERIODONTAL <sup>1</sup>                                     | TIPO DE ESTUDO | TEMPO DE OBSERVAÇÃO | MÉTODO         | PRINCIPAIS ACHADOS   |
|--------------------------------|---|---|----------------|---------------------|----------------|--|
| Mombelli <i>et al.</i> (1999)  | Biofilme subgengival de 185 chineses: 31 com periodontite (44,1 anos), 73 jovens trabalhadores de indústria (22,5 anos) e 81 adultos residentes na zona rural (39,7 anos) | Grupo com periodontite: periodontite do adulto de moderada a avançada | Transversal    | _____               | Cultura<br>PCR | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Média de idade dos 185 participantes 33,6 anos (16-66 anos).</li> <li>- Presença de <i>Aa</i> em 116 indivíduos (frequência de 63%), 65% do grupo com periodontite, 66% do grupo de trabalhadores da indústria e 58% dos adultos da zona rural.</li> <li>- Nenhuma das cepas encontradas de alta leucotoxicidade.</li> <li>- <i>Aa</i> é microorganismo comum na flora dos indivíduos chineses. Sugere que possa haver diferenças na composição microbiológica da placa subgengival desta população chinesa comparada aos norte-americanos e europeus.</li> </ul>   |
| Contreras <i>et al.</i> (2000) | Coletas de biofilme subgengival de 265 indivíduos: 69 caucasianos, 43 hispânicos, 27 asiáticos, 26 afro-americanos e 100 afro-caribenhos (15 – 35 anos)                   | Periodontite de início precoce, do adulto e saudáveis                 | Transversal    | _____               | PCR<br>Cultura | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 200 indivíduos exibiram periodontite de início precoce e do adulto, 65 adolescentes negros jamaicanos estavam periodontalmente normais.</li> <li>- Dentre 94 positivos para <i>Aa</i>, 11 adolescentes negros (Estados Unidos ou Jamaica) e um descendente hispânico, positivos para clones com supressão dos 530 pares de base.</li> <li>- Presença deste clone não encontrada em caucasianos ou asiáticos, sugerindo que a supressão é característica de indivíduos com descendência africana.</li> <li>- Cepas de <i>Aa</i> exibindo supressão dos pares de base do gene da leucotoxina ocorreram em quatro indivíduos com perda de inserção incidental, três com periodontite juvenil localizada, um com periodontite juvenil generalizada, um com periodontite do adulto e três periodontalmente saudáveis.</li> </ul> |

Quadro 2– Estudos transversais e longitudinais que mostraram a relação de *A. actinomycetemcomitans* com a doença periodontal

| AUTOR (ANO)                    | AMOSTRA  | CONDIÇÃO PERIODONTAL <sup>1</sup>  | TIPO DE ESTUDO | TEMPO DE OBSERVAÇÃO | MÉTODO  | PRINCIPAIS ACHADOS  |
|--------------------------------|--|--|----------------|---------------------|---|---|
| Haraszthy <i>et al.</i> (2000) | 1023 cepas de <i>Aa</i> de 146 indivíduos (afro-americanos, caucasianos, asiático-americanos): 71 PJJ, 11 pós PJJ, quatro periodontite de instalação precoce, 41 periodontite do adulto e 19 saudáveis | Periodontite juvenil localizada, periodontite de início precoce, periodontite do adulto e saudáveis  | Transversal    | —                   | Cultura<br>PCR<br>Dot Blot<br>AP-PCR<br>Southern Blot | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Clones de alta leucotoxicidade de <i>Aa</i> encontrados em 39 dos 71 indivíduos com periodontite juvenil localizada (55%) e em dois dos quatro com periodontite de instalação precoce (50%).</li> <li>- Nenhum dos pacientes com periodontite do adulto, pós-periodontite juvenil localizada e periodontalmente saudáveis exibiram clones de <i>Aa</i> de alta leucotoxicidade, mas clones de mínima leucotoxicidade.</li> <li>- Clones de alta leucotoxicidade infectam indivíduos mais jovens (média de idade: 13.95) e de mínima leucotoxicidade indivíduos mais velhos (média de idade: 35.47 anos).</li> <li>- Alguns indivíduos são portadores de clones de alta e mínima leucotoxicidade.</li> <li>- Análises demonstram transmissão intrafamiliar de <i>Aa</i>.</li> <li>- Alta leucotoxicidade de <i>Aa</i> consiste de tipo clonal único.</li> </ul> |
| Haubek <i>et al.</i> (2001)    | Biofilme de 301 adolescentes marroquinos (14-19 anos)  | Periodontite de instalação precoce (perda de inserção incidental, periodontite juvenil localizada e generalizada) e periodontalmente saudáveis | Transversal    | —                   | Cultura<br>PCR  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- De 131 indivíduos positivos para <i>Aa</i>, 19 para clone JP2. Destes, 15 com periodontite de instalação precoce e quatro (2.2%) saudáveis.</li> <li>- 98 (55,1%) apresentaram <i>Aa</i> mínima leucotoxicidade.</li> <li>- Dos 12 indivíduos com periodontite juvenil generalizada, todos positivos para <i>Aa</i>, 9 (75%) positivos para clone de alta leucotoxicidade.</li> <li>- Alta leucotoxicidade de <i>Aa</i> em 33,3% indivíduos com PJJ.</li> <li>- Forte associação entre presença de <i>Aa</i> com supressão dos 530 pares de base e periodontite de instalação precoce (OR= 29.4 – IC= 95%).</li> </ul>   |

Quadro 2– Estudos transversais e longitudinais que mostraram a relação de *A. actinomycetemcomitans* com a doença periodontal

| AUTOR (ANO)                   | AMOSTRA  | CONDIÇÃO PERIODONTAL <sup>1</sup>  | TIPO DE ESTUDO            | TEMPO DE OBSERVAÇÃO | MÉTODO      | PRINCIPAIS ACHADOS   |
|-------------------------------|--|--|---------------------------|---------------------|-------------|--|
| Haubek <i>et al.</i> (2002)   | Biofilme de 45 adolescentes marroquinos (14-19 anos)   | Perda de inserção $\geq$ 3mm em um ou mais sítios  | Transversal               | _____               | Cultura PCR | - Indivíduos com periodontite de instalação precoce e positivos para clones JP2 de <i>Aa</i> apresentam significante maior quantidade de dentes com perda de inserção $\geq$ 3 mm e perda de inserção em geral do que indivíduos com periodontite de instalação precoce sem presença de clones JP2 de <i>Aa</i> .  |
| Cortelli <i>et al.</i> (2003) | Biofilme subgingival de 136 indivíduos (14 – 76 anos): 47 com gengivite, 70 com periodontite crônica e 19 com periodontite agressiva | Gengivite, periodontite crônica e periodontite agressiva   | Transversal Caso-controle | _____               | PCR         | - Maior prevalência de clones de <i>Aa</i> de alta leucotoxicidade observada em indivíduos com periodontite agressiva, seguido de periodontite crônica e gengivite.<br>- Clones de alta leucotoxicidade foram correlacionados com indivíduos de idade $\leq$ 28 anos.<br>- Nenhuma correlação entre condição periodontal e clones de mínima leucotoxicidade.<br>- Análise de regressão multivariada mostrou correlação entre periodontite agressiva, idade e profundidade de sondagem. |
| Haubek <i>et al.</i> (2004)   | 121 adolescentes marroquinos que participaram de estudo anterior   | Saudáveis, periodontite de instalação precoce, juvenil localizada e generalizada. Perda de inserção incidental | Longitudinal              | dois anos           | Cultura PCR | - A presença no início do estudo do clone JP2 foi preditiva para perda de inserção clínica $\geq$ 3mm .<br>- Indivíduos positivos para clone JP2 apresentaram significante maior progressão de perda de inserção clínica do que aqueles que apresentavam clones de <i>Aa</i> não JP2.<br>- Indivíduos positivos para clones não-JP2 maior perda de inserção clínica do que aqueles negativos para <i>Aa</i> .  |

Quadro 2– Estudos transversais e longitudinais que mostraram a relação de *A. actinomycetemcomitans* com a doença periodontal

| AUTOR (ANO)                   | AMOSTRA  | CONDIÇÃO PERIODONTAL <sup>1</sup>   | TIPO DE ESTUDO | TEMPO DE OBSERVAÇÃO | MÉTODO | PRINCIPAIS ACHADOS  |
|-------------------------------|--|---|----------------|---------------------|--------|---|
| Haubek <i>et al.</i> (2008)   | 682 adolescentes de escolas públicas no Marrocos (média de idade: 12,6 anos) que carregavam clones JP2 e não JP2 no início do estudo | Periodontalmente saudáveis  | Longitudinal   | dois anos           | PCR    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Indivíduos que carregavam somente clones JP2 de <i>Aa</i> (RR = 18.0; IC 95%, IC 7.8-41.2, p&lt;0.0001) ou juntos com clones não JP2 (RR=12.4; IC 5.2-29.9, p&lt;0.0001) apresentaram significativo aumento no risco de perda de inserção periodontal.</li> <li>- Risco menos pronunciado de doença naqueles que carregavam clones não JP2 (RR= 3.0; IC 1.3-7.1, p=0.012).</li> <li>- Clone JP2 de <i>Aa</i> importante agente etiológico no início da perda de inserção em crianças e adolescentes.</li> <li>- Coocorrência de clones JP2 e não JP2 reduz o risco de desenvolvimento de periodontite, sugerindo competição pelo nicho ecológico entre estes clones de <i>Aa</i>.</li> </ul> |
| Cortelli <i>et al.</i> (2009) | 50 indivíduos (25 positivos para clones de <i>Aa</i> JP2 e 25 negativos)   | No mínimo quatro sítios com PS ≥4mm e NIC ≥3mm, apresentando indicação cirúrgica em no mínimo dois quadrantes | Longitudinal   | um ano              | PCR    | <p>Após um ano de tratamento dentre 25 positivos JP2:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-14 positivos para JP2</li> <li>-11 não detectáveis</li> </ul> <p>Dentre 25 não positivos para JP2:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-18 positivos JP2</li> <li>- Sete não detectáveis</li> <li>- Pacientes positivos para clones JP2 durante tratamento foram mais resistentes ao tratamento químico mecânico.</li> </ul>   |

Quadro 2– Estudos transversais e longitudinais que mostraram a relação de *A. actinomycetemcomitans* com a doença periodontal

| AUTOR (ANO)                  | AMOSTRA   | CONDIÇÃO PERIODONTAL <sup>1</sup>                                  | TIPO DE ESTUDO | TEMPO DE OBSERVAÇÃO | MÉTODO                          | PRINCIPAIS ACHADOS   |
|------------------------------|---|--|----------------|---------------------|---------------------------------|--|
| Haubek <i>et al.</i> (2009)  | Amostras de biofilme coletadas ao início, após um e dois anos de 365 crianças marroquinas em idade escolar (média idade: 12.6 anos) | Periodontalmente saudáveis   | Longitudinal   | dois anos           | PCR                             | - No início do estudo, 43 indivíduos (12%) estavam positivos para clones JP2; destes, 15 permaneceram positivos nas outras duas amostras.<br>- Risco relativo para desenvolvimento de periodontite agressiva, ajustado para a presença concomitante de outros genótipos de <i>Aa</i> , maior para indivíduos continuamente infectados pelo clone JP2 (RR= 13.9; IC 95%, 9-21). |
| Höglund <i>et al.</i> (2009) | 13 indivíduos   | Perda óssea radiográfica e colonizados por <i>Aa</i> 16 anos antes | Longitudinal   | 16 anos             | Checker board<br>Cultura<br>PCR | - Três (23%) dos 13 indivíduos infectados com <i>Aa</i> 16 anos antes apresentavam sinais precoces de perda de inserção e dois indivíduos continuavam positivos para <i>Aa</i> , mas nenhum pertencia a clone de alta leucotoxicidade<br>- Periodontite afetando dentição decídua não necessariamente predispõe à perda de inserção periodontal na dentição permanente.        |

*Aa*- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

PS- Profundidade de sondagem

*P. gingivalis*- *Porphyromonas gingivalis*

<sup>1</sup> da forma como descrita pelos autores

Fonte: Elaboração própria, com base nos autores da 1ª coluna

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PJL- Periodontite juvenil localizada

AP-PCR- PCR com *primers* arbitrários

### **O papel da leucotoxina na etiologia da periodontite agressiva**

A leucotoxina produzida pelo *A. actinomycetemcomitans* é uma toxina em repetição (RTX) (LALLY *et al.*, 1989) implicada como fator de virulência determinante em formas severas de doença periodontal (ZAMBON, 1985), uma vez que destrói os leucócitos polimorfonucleares humanos (BAEHNI *et al.*, 1981). Assim, permite ao microorganismo evadir-se da linha de defesa imune inata, também presente na bolsa periodontal (JOHANSSON; HANSTROM; KALFAS, 2000). É codificada por uma família multigene que consiste de quatro genes: *ltxA*, *ltxB*, *ltxC* e *ltxD* (LALLY *et al.*, 1989). A região promotora do gene da leucotoxina (*ltx*) parece estar presente em todas as cepas desta bactéria, assim como a sequência de nucleotídeos é semelhante entre as cepas de alta (JP2) e mínima leucotoxicidade (não JP2), porém as cepas JP2 apresentam supressão de 530 pares de base na região promotora da leucotoxina, enquanto as de mínima leucotoxicidade possuem a região promotora da leucotoxina completa. Assim, os níveis da expressão de leucotoxina variam muito entre essas cepas e altos níveis de produção de leucotoxina estão correlacionados com a presença da cepa JP2 (BROGAN *et al.*, 1994).

Bueno, Mayer e Dirienzo (1998), em estudo longitudinal, verificaram que indivíduos portadores de clones JP2 de *A. actinomycetemcomitans* apresentaram um maior risco de desenvolvimento de periodontite agressiva (*odds ratio*=22,5). Existe uma associação intensa entre a presença de cepas de *A. actinomycetemcomitans* com a supressão dos 530 pares de base em indivíduos que apresentam quadro de periodontite agressiva (HAUBEK *et al.*, 1995; HAUBEK *et al.*, 1996; BUENO; MAYER; DIRIENZO, 1998; HARASZTHY *et al.*, 2000; HAUBEK *et al.*, 2002; CORTELLI *et al.*, 2003; HAUBEK; HAVEMOSE-POULSEN; WESTERGAARD, 2006; CORTELLI *et al.*, 2009; HAUBEK *et al.*, 2009), enquanto nenhuma associação é encontrada com a presença de *A. actinomycetemcomitans* sem essa supressão (HAUBEK *et al.*, 2001; CORTELLI *et al.*, 2003), explicando, assim, um significativo aumento no potencial de virulência.

Para detecção de *A. actinomycetemcomitans* nas amostras de placa bacteriana, muitos estudos usavam a cultura microbiológica, porém muitas amostras não podiam ser avaliadas em razão do supercrescimento de outros microorganismos ou a ausência de crescimento bacteriano (HAUBEK *et al.*, 2001; HAUBEK *et al.*, 2002; HAUBEK *et al.*, 2004). Estes problemas metodológicos puderam ser resolvidos com o advento das técnicas de Biologia Molecular e do seu uso diretamente nas amostras de placa. Estes métodos não dependem da viabilidade das amostras, são menos sensíveis à presença de outros microorganismos potencialmente dominantes (HAUBEK *et al.*, 2004) e permitem a detecção



simultânea dos dois genótipos de *A. actinomycetemcomitans* baseados na diferença do tamanho das sequências amplificadas (HAUBEK *et al.*, 2008). Assim, diversos estudos citados no quadro 2 usaram técnica de PCR para detecção de *A. actinomycetemcomitans* e de seus clones de alta e mínima leucotoxicidade (BROGAN *et al.*, 1994; HAUBEK *et al.*, 1996; HAUBEK *et al.*, 1997; TINOCO *et al.*, 1997; BUENO; MAYER; DIRIENZO, 1998; TINOCO; SIVAKUMAR; PREUS, 1998; MOMBELLI *et al.*, 1999; CONTRERAS *et al.*, 2000; HARASZTHY *et al.*, 2000; HAUBEK *et al.*, 2001; HAUBEK *et al.*, 2002; CORTELLI *et al.*, 2003; HAUBEK *et al.*, 2004; HAUBEK; WESTERGAARD, 2004; HAUBEK; HAVEMOSE-POULSEN; WESTERGAARD, 2006; HAUBEK; POUSEN; KILIAN, 2007; HAUBEK *et al.*, 2008; CORTELLI *et al.*, 2009; HAUBEK *et al.*, 2009; HÖGLUND *et al.*, 2009).

### **Predileção racial e transmissão intrafamiliar de *A. actinomycetemcomitans* e de seus clones altamente leucotóxicos**

Em um estudo *in vitro*, citado no quadro 1, Haubek, Poulsen e Kilian (2007) observaram o padrão de mutação do clone JP2. Verificaram que este surgiu inicialmente como um genótipo distinto na parte da África banhada pelo Mediterrâneo há aproximadamente 2400 anos e se espalhou para o oeste da África. Isolados bacterianos obtidos de pacientes brasileiros e de norte-americanos eram indistinguíveis daqueles obtidos em pacientes do oeste da África, dando suporte à suposição de que o clone JP2 foi disseminado para a América durante o comércio transatlântico de escravos (HAUBEK; POUSEN; KILIAN, 2007).

A fim de delinear a possível relação entre cepas de *A. actinomycetemcomitans* exibindo supressão dos 530 pares de base na região promotora da leucotoxina e a sua provável predileção étnica, alguns estudos transversais, citados no quadro 2, avaliaram cepas de indivíduos de vários países e encontraram maior proporção de indivíduos afro-americanos, descendentes de africanos (HAUBEK *et al.*, 1997; CONTRERAS *et al.*, 2000; HARASZTHY *et al.*, 2000) e latinos (HARASZTHY *et al.*, 2000) portadores de clone de alta leucotoxicidade.

Para Contreras *et al.* (2000), a preferência racial de cepas de *A. actinomycetemcomitans* exibindo supressão nos 530 pares de base, pode decorrer de fatores sociais que limitam as possibilidades de transmissão bacteriana entre grupos étnicos ou a condições orais ecológicas e imunológicas singulares encontradas em negros que favorecem a colonização dessas cepas. Vários achados sustentam a conclusão de que um específico tropismo ligado ao hospedeiro é o maior fator atrás da restrita epidemiologia do clone JP2 (HAUBEK; POUSEN; KILIAN, 2007); porém, a razão para este aparente tropismo étnico permanece desconhecida (HAUBEK *et al.*, 2008).

Estudos em indivíduos norte-europeus e asiáticos com quadros de periodontite crônica e agressiva, gengivite e periodontalmente saudáveis, encontraram amostras positivas para *A. actinomycetemcomitans*, mas todas as cepas se apresentavam com características de mínima leucotoxicidade (HAUBEK *et al.*, 1995; MOMBELLI *et al.*, 1999). Haraszthy *et al.* (2000) encontraram, porém, 2% de indivíduos caucasianos expressando clones de alta leucotoxicidade. Assim, a ausência ou baixa prevalência deste clone em caucasianos ou asiáticos sugere que a supressão, representativa do clone JP2, é característica de indivíduos com descendência africana e periodontite agressiva (HAUBEK *et al.*, 1995; HAUBEK *et al.*, 1996; HAUBEK *et al.*, 1997; MOMBELLI *et al.*, 1999; CONTRERAS *et al.*, 2000).

A presença de *A. actinomycetemcomitans* é encontrada na maioria de pacientes com periodontite agressiva e em seus componentes familiares, demonstrando intensiva agregação familiar dessa patologia (ZAMBON, 1985; HAUBEK *et al.*, 1997; BUENO; MAYER; DIRIENZO, 1998; TINOCO; SIVAKUMAR; PREUS, 1998; HARASZTHY *et al.*, 2000; DE CARVALHO *et al.*, 2009). Tinoco, Sivakumar e Preus (1998) avaliaram membros familiares de pacientes portadores de periodontite agressiva e infectados por *A. actinomycetemcomitans*. Seus resultados mostraram que 41,2% dos pais e 58% dos irmãos também abrigavam esta bactéria e que alguns exibiam periodontite crônica ou agressiva. Existe evidência clínica de que cepas de *A. actinomycetemcomitans* de alta leucotoxicidade prevalecem em membros jovens de famílias com periodontite agressiva localizada que convertem o estado de saúde periodontal para doença (BUENO; MAYER; DIRIENZO, 1998). Em seus achados, Haubek *et al.* (1997) verificaram que vários irmãos ou pelo menos um dos parentes, em 12 de 28 famílias, de onde foram isolados clones JP2, apresentavam histórico de periodontite agressiva. Haraszthy *et al.* (2000), examinando transmissão intrafamiliar de *A. actinomycetemcomitans* em duas famílias latinas, uma caucasiana e três afro-americanas, verificaram que todos aqueles portadores de clones de alta leucotoxicidade exibiam um quadro de periodontite agressiva. Os autores verificaram ainda que, em uma das famílias, as crianças estavam inicialmente infectadas por clones de alta leucotoxicidade. Dois anos mais tarde, no entanto, três dessas crianças apresentaram o mesmo clone de mínima leucotoxicidade encontrado no pai. Observaram ainda que os pais estavam sempre infectados por clones de mínima leucotoxicidade, idêntico àqueles encontrados em um ou mais dos filhos.

### **Clones altamente e minimamente leucotóxicos e consequências sobre parâmetros clínicos na periodontite agressiva**

Uma complexa interação de vários fatores, incluindo predisposição genética do hospedeiro, higiene oral, composição e virulência bacteriana do biofilme subgengival, determina se um indivíduo desenvolve periodontite agressiva. A perda de inserção clínica começa quando a combinação entre esses fatores excede um baixo limiar de resistência do hospedeiro (HAUBEK *et al.*, 2008; DE CARVALHO *et al.*, 2009).

A média de progressão de perda de inserção clínica periodontal apresenta-se maior em indivíduos portadores de clones JP2, quando comparados àqueles que mostram clones não JP2 ou são negativos para *A. actinomycetemcomitans* (HAUBEK *et al.*, 2004; CORTELLI *et al.*, 2009). Além disso, parâmetros clínicos de profundidade de sondagem, nível de inserção clínico, índice de sangramento e índice de placa mostram-se estaticamente mais elevados em grupos de pacientes com periodontite positivos a clone JP2, quando comparados a grupos positivos a clone não JP2 (CORTELLI *et al.*, 2009).

O clone JP2 está presente antes da manifestação clínica de doença, o que oferece uma importante informação na relação temporal entre infecção por *A. actinomycetemcomitans* e periodontite agressiva em adolescentes (CONTRERAS *et al.*, 2000; HAUBEK *et al.*, 2008). Estudos transversais oferecem conclusões limitadas entre a infecção de indivíduos com o clone JP2 de *A. actinomycetemcomitans* e o início de periodontite agressiva e não podem tecer conclusões para os efeitos dessa correlação sobre o periodonto com o passar do tempo. Assim, dando continuidade a uma série de estudos prévios (HAUBEK *et al.*, 1995; HAUBEK *et al.*, 1996; HAUBEK *et al.*, 1997; TINOCO *et al.*, 1997; HAUBEK *et al.*, 2001; HAUBEK *et al.*, 2002; HAUBEK; POUSEN; KILIAN, 2007), o grupo de pesquisadores que mais estuda este assunto, publicou estudos longitudinais (HAUBEK *et al.*, 2004; HAUBEK *et al.*, 2008; HAUBEK *et al.*, 2009) que avaliaram se a presença do clone JP2 era preditiva para perda de inserção clínica e o desenvolvimento de periodontite agressiva, quando comparada à ausência deste clone. Observaram maior risco relativo para desenvolvimento de perda de inserção periodontal (RR= 18,0) (HAUBEK *et al.*, 2008) e periodontite agressiva (RR= 13,9) (HAUBEK *et al.*, 2009), naqueles indivíduos continuamente infectados pelo clone JP2. Ainda, a presença deste clone foi preditiva para a progressão da perda de inserção periodontal  $\geq 3$ mm durante os dois anos do estudo (OR= 14,5) (HAUBEK *et al.*, 2004). Estes estudos se desenvolveram com tempos de observação de dois anos e os pacientes apresentavam médias de idades semelhantes. Outra variável a ser discutida entre os estudos é a condição periodontal ao início deles. Em dois, os indivíduos eram saudáveis (HAUBEK *et al.*, 2008; HAUBEK *et*

*al.*, 2009). Em outro, a condição periodontal dos indivíduos não era uniforme. Essa variava desde indivíduos periodontalmente saudáveis àqueles com periodontite agressiva (HAUBEK *et al.*, 2004). Sabe-se que indivíduos com doença periodontal apresentam diferença na progressão da perda de inserção quando comparados a periodontalmente saudáveis, podendo este fato promover alterações no resultado final. Mesmo assim, este estudo tem sua contribuição por ser o primeiro ensaio longitudinal a demonstrar que a presença do clone JP2 de *A. actinomycetemcomitans* resulta em aumento do risco de progressão de perda de inserção clínica.

Experimento recente (HÖGLUND *et al.*, 2009) com período de observação de 16 anos demonstrou que a presença de *A. actinomycetemcomitans* e perda óssea precoce na dentição decídua não necessariamente predisuseram os indivíduos à perda de inserção periodontal na dentição permanente. Este estudo, no entanto, apresentou como critérios de inclusão indivíduos portadores de perda óssea radiográfica interproximal e colonizados com *A. actinomycetemcomitans*. Não havia correlação com os clones de alta e mínima leucotoxicidade e os indivíduos eram oriundos de etnias diferentes: sete asiáticos, cinco caucasianos e dois africanos. Sabe-se que nenhuma associação entre a presença isolada de *A. actinomycetemcomitans* sem correlacionar a tipos clonais virulentos e predisposição à periodontite agressiva é encontrada (BUENO; MAYER; DIRIENZO, 1998) e que crianças continuamente infectadas pelo clone JP2 de *A. actinomycetemcomitans* apresentam maior risco relativo (RR=13.9) para desenvolvimento de periodontite agressiva (HAUBEK *et al.*, 2009). Como já mencionado, este clone em particular se encontra ausente de caucasianos e asiáticos (MOMBELLI *et al.*, 1999; CONTRERAS *et al.*, 2000). Assim, os resultados do estudo de Høglund *et al.* (2009) não são comparáveis aos estudos longitudinais anteriores.

Cortelli *et al.* (2009) conduziram estudo longitudinal em indivíduos brasileiros, correlacionando a terapêutica e parâmetros periodontais em pacientes infectados pelo clone JP2 comparados àqueles infectados pelo clone não JP2. Em resposta ao tratamento periodontal, os parâmetros de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e índice de placa decresceram em ambos os grupos; porém, no grupo não JP2, melhores resultados foram observados no nível de profundidade de sondagem e de inserção clínica. No grupo dos pacientes JP2 positivos, aqueles que permaneceram positivos a este clone durante os 12 meses de estudo apresentaram: maiores índices de placa e maior resistência à terapia química mecânica do que aqueles não detectáveis aos clones JP2, enquanto a eliminação do clone JP2 fez diminuir a inflamação gengival. Assim, a identificação precoce e a eliminação dos clones

JP2 de *A. actinomycetemcomitans* das bolsas periodontais constituem fatores-chave na prevenção da progressão da periodontite associada a este clone (CORTELLI *et al.*, 2009).

Alguns indivíduos são portadores de clones de alta e mínima leucotoxicidade, podendo estar transitoriamente infectados com ambos em algum momento (HARASZTHY *et al.*, 2000). Haubek *et al.* (2008; 2009) observam que a ocorrência de clones JP2 e não JP2 em um mesmo indivíduo reduz o risco de desenvolvimento de periodontite, sugerindo que haja competição pelo nicho ecológico entre estes clones.

Um aspecto interessante foi verificado em um estudo realizado no Brasil quanto à presença de clones JP2 em diversos tipos de doença periodontal (CORTELLI *et al.*, 2003). Clones de alta leucotoxicidade foram encontrados em indivíduos com periodontite agressiva, seguido de periodontite crônica e gengivite. Apesar de nenhuma diferença significativa ter sido observada entre periodontite crônica e gengivite relacionada à presença de clones altamente leucotóxicos, este é um achado diferente dos já publicados. Além disso, clones de alta leucotoxicidade foram correlacionados com indivíduos de idade  $\leq 28$  anos (CORTELLI *et al.*, 2003).

Para Haraszthy *et al.* (2000) 55% dos indivíduos com periodontite agressiva estavam positivos para clones de alta leucotoxicidade. Apesar dos indivíduos com periodontite agressiva apresentarem clones de alta e mínima leucotoxicidade, os indivíduos com periodontite crônica, agressiva generalizada e saudáveis exibiram apenas clones de mínima leucotoxicidade. A média de idade para indivíduos infectados para clones de alta leucotoxicidade foi de 13,95 anos (5-28 anos) enquanto para indivíduos que exibiam clones de mínima leucotoxicidade foi de 35,47 anos (6-65 anos).

Tinoco *et al.* (1997) encontraram dentre 36 indivíduos brasileiros que apresentavam quadros de saúde periodontal, gengivite, periodontite agressiva e crônica positivos para *A. actinomycetemcomitans* somente cinco (14%) positivos para clones JP2, sendo três apresentando periodontite agressiva localizada e dois saudáveis. Mombelli *et al.* (1999) não encontraram cepas de alta leucotoxicidade em indivíduos chineses com quadros de doença periodontal, apesar de frequência de 63% de indivíduos positivos para *A. actinomycetemcomitans*. Três grupos participaram da amostra: um de indivíduos com periodontite (44,1 anos), outro de trabalhadores da indústria (22,5 anos) e terceiro de adultos residentes na zona rural (39,7 anos). Haubek *et al.* (2001) encontraram dentre 12 indivíduos (14-19 anos) com periodontite agressiva generalizada, nove positivos para clone de alta leucotoxicidade e três com clones de mínima leucotoxicidade. Contreras *et al.* (2000) encontraram dentre 94 pacientes positivos para *A. actinomycetemcomitans*, 11 positivos para

clone de alta leucotoxicidade, com apenas um indivíduo (20 anos) com periodontite juvenil generalizada.

### 3 OBJETIVOS

- Detectar a presença de clones que demonstram alta ou mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos portadores de periodontite agressiva e em seus membros familiares.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Seleção da Amostra

Este estudo foi transversal, realizado com suporte na avaliação de 35 pacientes portadores de periodontite agressiva (grupo-teste) e pelo menos um e até quatro de seus parentes consanguíneos - pai, mãe, filho ou irmão. Foram obtidos parentes de 26 participantes do grupo-teste, totalizando 33 parentes de portadores de periodontite agressiva. Também foram utilizados como grupo-controle 41 pacientes portadores de periodontite crônica.

Tamanho de amostra semelhante ao proposto neste estudo foi utilizado por outros autores (HARASZTHY *et al.*, 2000; HAUBEK *et al.*, 2002), que conseguiram encontrar algum tipo de associação entre a presença de *A. actinomycetemcomitans* e de seus clones virulentos e a ocorrência ou progressão da periodontite agressiva.

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. Referida 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, devendo ambos acometer indivíduos sistemicamente saudáveis e com rápida perda de inserção e destruição óssea.

Os portadores de periodontite crônica também foram classificados de acordo com critérios da AAP (FLEMMIG, 1999; AAP, 2000a, 2000b):

- destruição de leve e moderada é caracterizada pela presença de sítios periodontais com profundidade de sondagem de até 6 mm e com perda de inserção clínica de até 4 mm;

- na destruição avançada há a presença de profundidade de sondagem maior do que 6 mm e perda de inserção clínica maior do que 4 mm.

Os indivíduos não deveriam ter recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses, ter feito 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. Os parentes de portadores de periodontite agressiva não poderiam ser desdentados completos e deveriam apresentar pelos menos os primeiros molares permanentes irrompidos.

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 0,5mm 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 - valor obtido com base na margem gengival até o fundo do sítio periodontal; e
- Nível de inserção clínico - 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 15<sup>2</sup> por único examinador, calibrado antes e ao final do estudo, sendo utilizado um teste estatístico apropriado para estas aferições (APÊNDICE A).

### 4.3 Procedimentos Microbiológicos

#### 4.3.1 Coleta das Amostras

Amostras de placa bacteriana subgingival foram coletadas com cones de papel estéreis<sup>3</sup> (tamanho 35), com a inserção de dois cones no sítio escolhido, por 20 segundos. Foram coletadas de sítios proximais do dente com maior perda de inserção e maior profundidade de sondagem. Nos parentes consanguíneos dos indivíduos com periodontite agressiva que não apresentassem doença periodontal, foram colhidas de sítios proximais de primeiros molares permanentes e incisivos.

Previamente à coleta, a placa bacteriana supragengival 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 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O em 1000ml H<sub>2</sub>O) e acondicionadas sob temperatura de - 80 °C, até serem manipuladas. A avaliação microbiológica foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

#### 4.3.2 Avaliação Microbiológica

Antes da análise da presença das bactérias, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos para a região 16S do DNA ribossômico (16S rDNA) foi realizada para confirmação da presença de DNA dos microrganismos nas amostras. Após, as amostras foram avaliadas mediante a técnica de PCR quanto à presença de *A. actinomycetemcomitans* (região 16S do DNA ribossômico). Quando a presença deste microrganismo foi detectada, as amostras foram submetidas à análise também mediante PCR,

---

<sup>2</sup> Trinity Indústria e Comércio Ltda., São Paulo-SP, Brasil.

<sup>3</sup> DENTSPLY Ind. e Com. Ltda- Rio de Janeiro, Brasil.

para avaliar sua diversidade clonal: clones com expressão de alta ou mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans*.

#### 4.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras bacterianas coletadas foram previamente preparadas em *kit* InstaGene Purification Matrix™<sup>4</sup> (APÊNDICE B) para extração do DNA. Alíquotas de 20 µL do sobrenadante obtido foram adicionados a 30 µL de reagentes para PCR (tampão para PCR com 25 µM MgCl<sub>2</sub><sup>5</sup>, 0,2 µM de dNTP Mix<sup>5</sup>, 1,25 U de *Taq* polimerase<sup>5</sup> e volume correspondente a 100 ng de cada *primer*<sup>6</sup>), obtendo-se 50 µL de volume final.

Os *primers*<sup>6</sup> utilizados e a região que amplificam estão dispostos na Tabela 1. Amostras de água e cepas de *A. actinomycetemcomitans* de referência (Tabela 2) foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente (Figuras 1 e 2), nas eletroforeses em gel de agarose. A amplificação<sup>7</sup> da 16SrDNA e de *A. actinomycetemcomitans* (região 16S do DNA ribossômico) foi realizada com um ciclo inicial a 94°C por dez minutos, seguido de 30 ciclos a 96 °C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s, com extensão final a 72°C por dez minutos (HARASZTHY *et al.*, 2000). Para a região promotora da *ltx* a amplificação foi realizada com um ciclo inicial a 94°C por cinco minutos, 30 ciclos a 94°C por um minuto, 60°C por um minuto e 72°C por dois minutos, seguidos de uma extensão final a 72°C por oito minutos (POULSEN; ENNIBI; HAUBEK, 2003). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio - 10µg/mL. As concentrações do gel de agarose variaram de 1,5% quando a reação era para a região 16S do DNA ribossômico e presença de *A. actinomycetemcomitans* a 2,0% para avaliar a diversidade clonal do *A. actinomycetemcomitans*. Os géis foram fotografados<sup>8</sup> em transiluminador de luz ultravioleta<sup>9</sup> e então analisada a presença de bandas fluorescentes que evidenciavam a presença do microrganismo ou do fator de virulência estudado.

---

<sup>4</sup> BioRad Laboratories. Hercules, CA - USA

<sup>5</sup> Promega Corporation, USA

<sup>6</sup> Invitrogen Brasil Ltda - São Paulo, SP, Brasil.

<sup>7</sup> Termociclador Biocycler™ - Biosystems Importadora Ltda – Curitiba, PR, Brasil.

<sup>8</sup> Canon – Powershot A640 – Canon, USA.

<sup>9</sup> Transiluminador UV – LTA/LTB GE, Loccus Biotecnologia - São Paulo, SP, Brasil.

Tabela 1 – Sequência de *primers* utilizados no estudo

| REGIÃO AMPLIFICADA                               | PRIMERS (5' - 3')  | TAMANHO DA SEQUÊNCIA (PARES DE BASES)                            | REFERÊNCIA                                 |
|--|--|--|--|
| 16S rDNA   | GGA CTA YAG GGT ATC TAA T<br>AGA GTT TGA TCM TGG                   | 789  | (WILSON;<br>BLITCHINGTON;<br>GREENE, 1990) |
| A.<br><i>actinomycetemcomitans</i><br>(16S rDNA) | AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC<br>TTC<br>ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT   | 637  | (ASHIMOTO <i>et al.</i> , 1996)            |
| A.<br><i>actinomycetemcomitans</i><br><i>ltx</i> | GCC GAC ACC AAA GAC AAA<br>GTC T<br>GCC CAT AAC CAA GCC ACA<br>TAC | alta leucotoxicidade<br>700<br>mínima<br>leucotoxicidade<br>1200 | (POULSEN;<br>ENNIBI;<br>HAUBEK, 2003)      |

Fonte: Elaboração própria, com referência na literatura

Tabela 2 – Cepas de referência de *A. actinomycetemcomitans* utilizadas como controle positivo

| TIPO CLONAL                     | CEPA                                   |
|---------------------------------|--|
| 16S rDNA                        | <i>A. actinomycetemcomitans</i> JP2    |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | <i>A. actinomycetemcomitans</i> JP2    |
| Alta Leucotoxicidade            | <i>A. actinomycetemcomitans</i> JP2    |
| Mínima Leucotoxicidade          | <i>A. actinomycetemcomitans</i> HK1605 |

Fonte: Elaboração própria, com referência na literatura

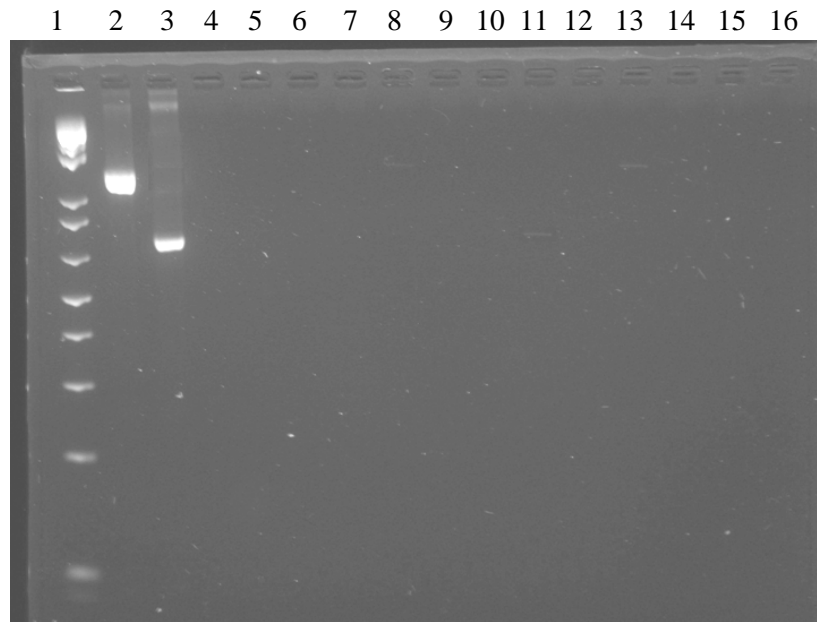


Figura 1 – Linha 1: marcador de peso molecular<sup>6</sup> (1Kb); Linha 2: controle positivo mínima leucotoxicidade (*A. actinomycetemcomitans* HK1605); Linha 3: controle positivo alta leucotoxicidade (*A. actinomycetemcomitans* JP2); Linha 11: amostra amplificada alta leucotoxicidade; Linhas 8 e 13: amostra amplificada mínima leucotoxicidade; Linha 16: controle negativo: água.

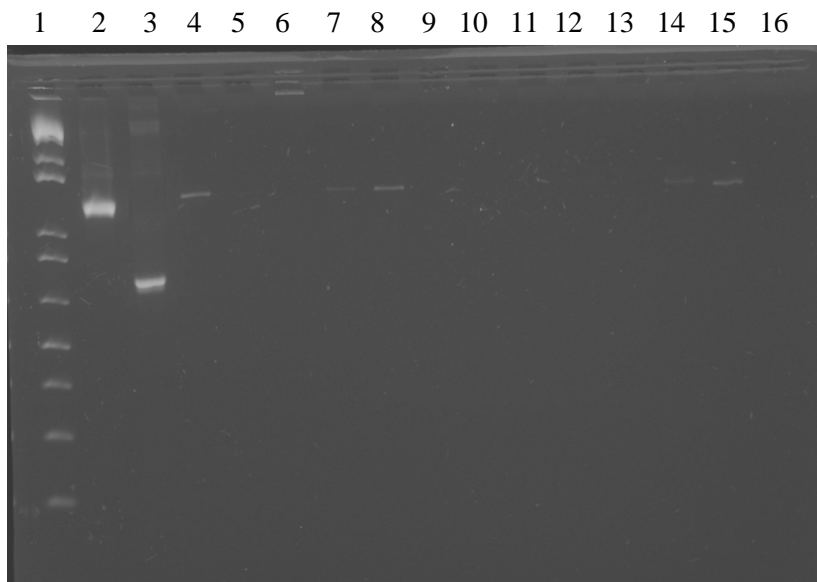


Figura 2 – Linha 1: marcador de peso molecular<sup>6</sup> (1Kb); Linha 2: controle positivo mínima leucotoxicidade (*A. actinomycetemcomitans* HK1605); Linha 3: controle positivo alta leucotoxicidade (*A. actinomycetemcomitans* JP2); Linhas 4, 7, 8, 14 e 15: amostras amplificadas mínima leucotoxicidade; Linha 16: controle negativo: água.

<sup>6</sup>Invitrogen Brasil Ltda - São Paulo, SP, Brasil.

#### 4.4 Análise Estatística

Os dados clínicos dos indivíduos dos três grupos foram submetidos ao Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação desses dados entre os grupos, foi utilizado o Teste ANOVA a um critério ou o Teste de Kruskal-Wallis, quando os indicadores exibiam normalidade ou não, respectivamente. Quando foram comparados apenas dois grupos, foram utilizados os testes 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 *A. actinomycetemcomitans* e a ocorrência de periodontite agressiva, foi utilizado o Teste do Qui-quadrado, com a concomitante 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 InStat<sup>10</sup>.

---

<sup>10</sup> Graph Pad Software Inc. San-Diego, CA-EUA

## 5 RESULTADOS

A amostra estudada foi composta por 109 indivíduos alocados em três grupos: periodontite agressiva (PAG) e seus familiares (FAM) e periodontite crônica (PC). A tabela 3 relaciona a amostra estudada com a idade e características clínicas periodontais.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a idade de todos os grupos. O grupo PC apresentou indivíduos mais velhos, seguido pelo grupo PAG e FAM que indicou indivíduos mais jovens. Quando avaliadas as PS (profundidades de sondagem) de todos os sítios e do sítio coletado para análise microbiológica, observou-se diferença significativa entre os três grupos com maiores valores no grupo PAG. Com relação aos valores de NIC (nível de inserção clínica), diferença também significativa foi constatada quando comparados os grupos PC e FAM, PAG e FAM, apresentando o grupo PAG os maiores valores, seguido pelo grupo PC. Foram comprovadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores de IP (índice de placa) e IG (índice gengival) apenas entre os grupos PC e FAM (Tabela 3).



Tabela 3 - Características clínicas e periodontais dos participantes do estudo

| <b>GRUPOS</b>                                    | <b>PERIODONTITE<br/>AGRESSIVA<br/>(PAG)</b> | <b>FAMILIARES<br/>(FAM)</b> | <b>PERIODONTITE<br/>CRÔNICA<br/>(PC)</b> |
|--|---|-----------------------------|--|
| <b>N</b>   | 35  | 33                          | 41                                       |
| <b>Média de idade em<br/>anos<br/>(variação)</b> | 33,9 ± 7,1<br>(22-48)                       | 22,8 ± 11,4<br>(8-49)       | 44,1 ± 9,4*<br>(27-60)                   |
| <b>PS (média)</b>                                | 3,7 ± 0,9*                                  | 2,4 ± 0,5                   | 2,9 ± 0,5                                |
| <b>NIC (média)</b>                               | 4,3 ± 1,2***                                | 2,0 ± 1,4                   | 3,8 ± 1,1                                |
| <b>Média<br/>PS (SC)</b>                         | 9,8 ± 2,1*                                  | 5,3 ± 2,0                   | 8,2 ± 2,3                                |
| <b>Média<br/>NIC (SC)</b>                        | 10,7 ± 2,8***                               | 4,6 ± 3,3                   | 9,4 ± 2,9                                |
| <b>IG (média %)</b>                              | 14,9 ± 10,5%                                | 10,7 ± 13,5%                | 20,6 ± 19%**                             |
| <b>IP (média %)</b>                              | 32,3 ± 19,7%                                | 24,8 ± 19,6%                | 33,5 ± 14,0%**                           |

PS - profundidade de sondagem

NIC - nível de inserção clínico

IG - índice gengival

IP - índice de placa

SC - sítio coletado para análise microbiológica

\*diferença estatisticamente significativa entre os grupos

\*\* diferença estatisticamente significativa entre os grupos PC e FAM

\*\*\* diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto PAG e PC

Com relação à média de dentes, o grupo PAG apresentou  $25,0 \pm 2,3$ , o grupo FAM  $24,2 \pm 5,3$  e o grupo PC  $22,0 \pm 3,5$ . Os Gráficos 1 e 2 mostram a distribuição de PS e NIC por dentes estratificados em  $\geq 5$ ,  $\geq 6$ ,  $\geq 7$  e  $\geq 8$  mm nos grupos PAG e PC. Verificou-se que o grupo PAG demonstrou maiores valores com relação a todos os cortes apresentados, sendo observados maiores valores no grupo PAG.

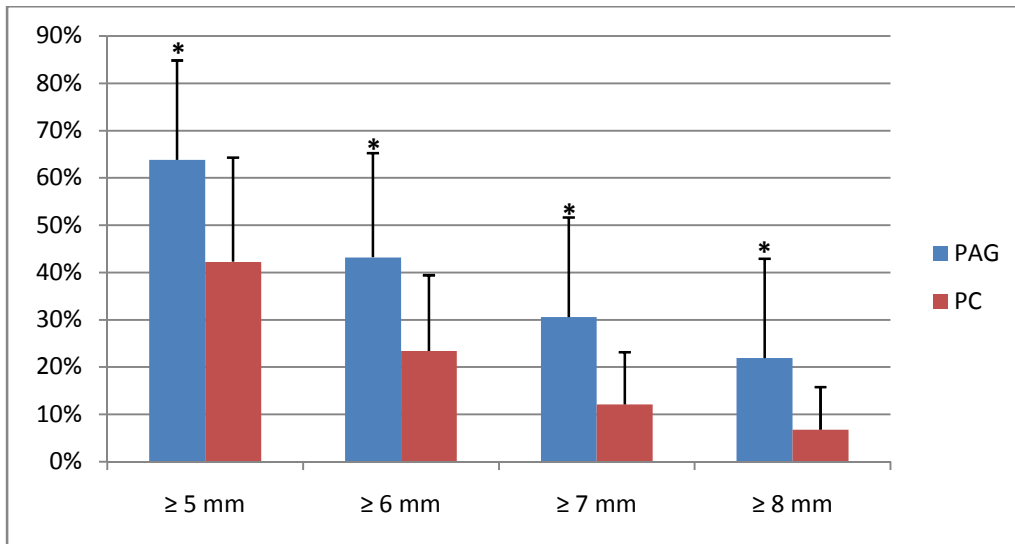


Gráfico 1 – Distribuição de maior valor de PS por dente nos pacientes do grupo PAG e PC

\* $p < 0,05$

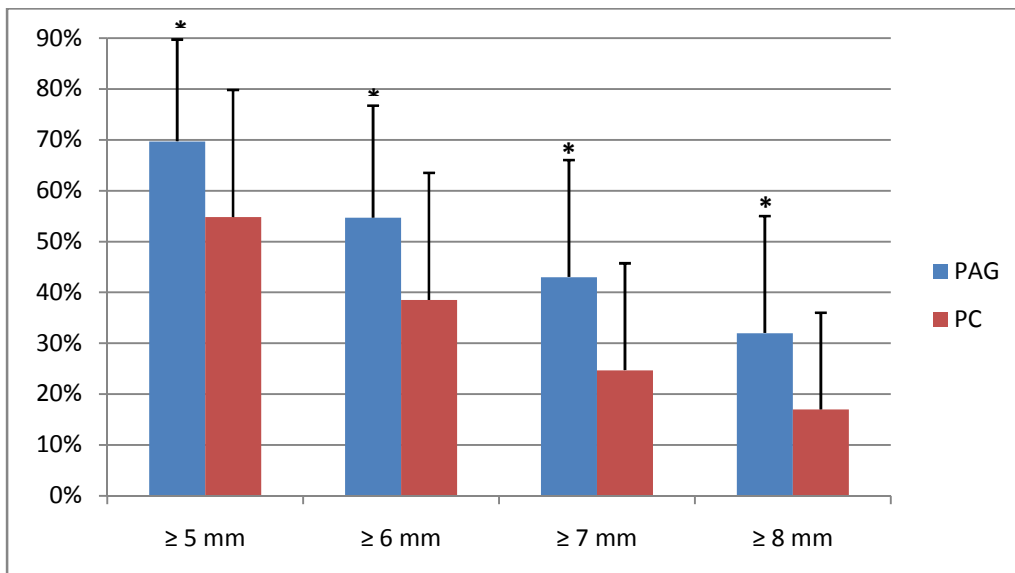


Gráfico 2 – Distribuição de maior valor de NIC por dente nos pacientes do grupo PAG e PC

\* $p < 0,05$

A tabela 4 apresenta a condição periodontal de acordo com a presença ou ausência de *A. actinomycetemcomitans* em cada grupo estudado. No grupo FAM, dez parentes (30,3%) apresentaram quadro de periodontite agressiva, dentre eles 3 (30%) estavam positivos para *A. actinomycetemcomitans*, 12 (36,3%) periodontite crônica com apenas um indivíduo positivo para a bactéria estudada e 11 (33,3%) estavam periodontalmente saudáveis/gengivite, todos negativos quanto à presença de *A. actinomycetemcomitans*.

Tabela 4 – Condição periodontal e presença de *A. actinomycetemcomitans* em cada grupo

|   | PAG                   |                       | PC  |                        | Periodontite Agressiva |  | FAM       |                        | Saudáveis/<br>Gengivite |                      | TOTAL                 |
|---|-----------------------|-----------------------|---|------------------------|------------------------|--|-----------|------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
|   | Aa+                   | Aa-                   | Aa+   | Aa-                    | Aa+                    | Aa-  | Aa+       | Aa-                    | Aa+                     | Aa-                  |                       |
| <b>N</b>  | 20*                   | 15                    | 15  | 26                     | 3*                     | 7  | 1         | 11                     | -                       | 11                   | 109                   |
| <b>%</b>  | 57,2%                 | 42,8%                 | 36,6%   | 63,4%                  | 9,1%                   | 21,2%  | 3%        | 33,3%                  |                         | 33,3%                |                       |
| <b>Média de idade em anos (variação)</b>                      | 34,6 ± 6,9<br>(25-48) | 33,1 ± 7,4<br>(22-45) | 44,2 ± 8,6<br>(32-58)                             | 43,8 ± 10,1<br>(27-60) | 24,3 ± 5,9<br>(20-31)  | 19,3 ± 8,3<br>(10-36)                          | 22        | 31,8 ± 10,9<br>(15-49) | -                       | 12,0 ± 3,2<br>(8-18) | 34,4 ± 12,8<br>(8-60) |
| <b>PS</b>   | 3,9 ± 1,0             | 3,4 ± 0,7             | 3,0 ± 0,5   | 2,9 ± 0,5              | 3,1 ± 0,5              | 2,8 ± 0,4                                      | 2,2 ± 1,3 | 2,4 ± 0,3              | -                       | 1,9 ± 0,2            | 3,0 ± 0,8             |
| <b>NIC</b>  | 4,6 ± 1,3             | 3,9 ± 0,8             | 3,8 ± 1,0   | 3,8 ± 1,2              | 3,2 ± 0,6              | 2,8 ± 0,7                                      | 2,3 ± 1,2 | 2,8 ± 0,7              | -                       | -                    | 3,4 ± 1,6             |
| <b>PS(SC)</b>   | 10,3 ± 2,4            | 9,2 ± 1,6             | 8,1 ± 2,2   | 8,3 ± 2,4              | 6,3 ± 1,2              | 6,9 ± 2,0                                      | 9         | 5,6 ± 1,0              | -                       | 3 ± 0,7              | 7,8 ± 2,8             |
| <b>NIC (SC)</b>   | 11,2 ± 3,2            | 10 ± 2,1              | 9,5 ± 3,0   | 9,3 ± 3,0              | 5,7 ± 1,2              | 7,1 ± 2,3                                      | 9         | 5,9 ± 1,4              | -                       | -                    | 8,3 ± 4,0             |
| PS- profundidade de sondagem                                  |                       |                       | NIC – nível de inserção clínico                   |                        |                        | SC –sítio coletado para análise microbiológica |           |                        |                         |                      |                       |
| (Aa+) presença de <i>A. actinomycetemcomitans</i>             |                       |                       | (Aa-) ausência de <i>A. actinomycetemcomitans</i> |                        |                        |  |           |                        |                         |                      |                       |
| *Grupos onde foram encontrados clones de alta leucotoxicidade |                       |                       |   |                        |                        |  |           |                        |                         |                      |                       |

Na tabela 5, os indivíduos estudados foram agrupados de acordo com a condição periodontal e presença ou ausência de *A. actinomycetemcomitans*. Considerando todos os indivíduos da amostra, observa-se que, quanto à presença de *A. actinomycetemcomitans*, 23 (51,1%) dos indivíduos com periodontite agressiva e 16 (30,1%) daqueles com periodontite crônica estavam positivos. Não foi encontrada presença desta bactéria nos pacientes saudáveis/gengivite. A presença de *A. actinomycetemcomitans* foi associada com a condição clínica de periodontite agressiva (*odds ratio*=3,1; Intervalo de Confiança: 1,4-7,0;  $p=0,009$ ). Diferença estatisticamente significativa foi observada quando comparados os valores de PS e NIC dos pacientes com periodontite agressiva positivos e negativos para *A. actinomycetemcomitans*, residindo os maiores valores naqueles positivos para a presença desta bactéria.

Tabela 5 – Presença de *A. actinomycetemcomitans* de acordo com condição periodontal

|                                  | TOTAL                  |                      |                       |                        |                      |                      |
|----------------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
|                                  | Periodontite Agressiva |                      | Periodontite Crônica  |                        | Saudáveis/ Gengivite |                      |
|                                  | Aa+                    | Aa-                  | Aa+                   | Aa-                    | Aa+                  | Aa-                  |
| <b>N</b>                         | 23*                    | 22                   | 16                    | 37                     | -                    | 11                   |
| <b>%</b>                         | 51,2%                  | 48,8%                | 30,2%                 | 69,8%                  |                      | 100%                 |
| <b>Média de idade (Variação)</b> | 33,5 ± 7,5<br>(20-48)  | 28,7 ± 10<br>(10-45) | 43,1 ± 9,9<br>(22-58) | 41,1 ± 10,6<br>(22-60) | -                    | 12,7 ± 3,3<br>(8-18) |
| <b>PS</b>                        | 3,8 ± 0,9**            | 3,2 ± 0,7            | 2,9 ± 0,5             | 2,7 ± 0,5              | -                    | 1,9 ± 0,2            |
| <b>NIC</b>                       | 4,4 ± 1,3**            | 3,6 ± 0,9            | 3,7 ± 1,1             | 3,5 ± 1,2              | -                    | -                    |
| <b>PS (SC)</b>                   | 9,7 ± 2,6              | 8,5 ± 2              | 8,1 ± 2               | 7,5 ± 2,4              | -                    | 3,3 ± 0,9            |
| <b>NIC (SC)</b>                  | 10,5 ± 3,5             | 9,1 ± 2,5            | 9,4 ± 2,8             | 8,4 ± 3,0              | -                    | -                    |

PS - profundidade de sondagem

SC - sítio coletado para análise microbiológica

(Aa+) presença de *A. actinomycetemcomitans*

\*associação estatisticamente significativa - (*odds ratio* = 3,1; intervalo de confiança: 1,4-7,0;  $p=0,009$ ).

\*\*diferença estatisticamente significativa entre periodontite agressiva (Aa+) x (Aa-)

NIC - nível de inserção clínico

Aa- *A. actinomycetemcomitans*

(Aa-) ausência de *A. actinomycetemcomitans*

Dentre os indivíduos positivos para *A. actinomycetemcomitans*, 37 (94,8%) exibiram clones de mínima leucotoxicidade e apenas dois (5,1%) exibiram clones de alta leucotoxicidade, ambos com periodontite agressiva generalizada e provenientes de famílias diferentes; um pertencente ao grupo PAG e outro ao grupo FAM, este irmão de um indivíduo do grupo PAG. Dentre todos os indivíduos da amostra examinada com periodontite agressiva, apenas um do grupo FAM apresentou quadro de periodontite agressiva localizada - uma criança de dez anos. Os demais exibiram quadro de periodontite agressiva generalizada.

## 6 DISCUSSÃO

Este experimento teve como objetivo avaliar a presença de clones de *A. actinomycetemcomitans* com alta ou mínima leucotoxicidade em indivíduos portadores de periodontite agressiva e em seus componentes familiares consaguíneos. Os resultados indicam a associação da presença de *A. actinomycetemcomitans* com a ocorrência de periodontite agressiva generalizada, pois 51,1% dos pacientes com esta doença (média de 33,5 anos) estavam positivos para essa bactéria.

Vários estudos descreveram a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* em formas de doença periodontal semelhantes à periodontite agressiva generalizada. Rodenburg *et al.* (1990) encontraram em 55% dos pacientes (14-52 anos), Wolff *et al.* (1993) em 38% (28-78 anos), Muller, Lange e Muller (1993) em 58% de indivíduos com média de idade 28,9 anos e Kamma, Nakou e Manti (1995) em 20% de adultos (25-35 anos). López, Mellado e Leighton (1996) não encontraram, entretanto, presença de *A. actinomycetemcomitans* em seis indivíduos com periodontite agressiva generalizada com idades de 23 e 26 anos.

Nos resultados deste ensaio, apenas dois indivíduos com periodontite agressiva generalizada exibiram clones de *A. actinomycetemcomitans* de alta leucotoxicidade, com 37 e 31 anos. Entre todos os indivíduos com periodontite agressiva, apenas um membro familiar com dez anos apresentou quadro de doença localizada, estando os demais com quadro de periodontite agressiva generalizada. Dos indivíduos da amostra, sobretudo exibindo quadro de periodontite agressiva, 91,3% estavam positivos para clones de mínima leucotoxicidade.

Clone de *A. actinomycetemcomitans* de alta leucotoxicidade é relacionado com periodontite agressiva localizada (HAUBEK *et al.*, 1997; TINOCO *et al.*, 1997; BUENO; MAYER; DIRIENZO, 1998; HARASZTHY *et al.*, 2000; HAUBEK *et al.*, 2001). Haraszthy *et al.* (2000) observaram que indivíduos com média de idade de 13,9 eram mais frequentemente infectados por clones de alta leucotoxicidade, enquanto aqueles com média de idade de 35,4 não os apresentam; ou seja, clones de alta leucotoxicidade são encontrados em indivíduos jovens com quadros de periodontite agressiva localizada e com média de variação de idade inferior à da amostra sob comento. A média de idade encontrada em indivíduos que não apresentavam alta leucotoxicidade por Haraszthy *et al.* (2000), foi semelhante à desta amostra (34,0 anos), além de

se apresentarem apenas sete pacientes com periodontite agressiva e idade inferior ou igual a 28 anos.

Mombelli *et al.* (1999) não encontraram cepas de alta leucotoxicidade em indivíduos com periodontite e média de idade de 33,6 anos. Contreras *et al.* (2000) encontraram apenas um indivíduo com periodontite agressiva generalizada exibindo clone de alta leucotoxicidade, enquanto Haraszthy *et al.* (2000) identificaram este clone apenas em pacientes com periodontite agressiva localizada. Haubek *et al.* (2001) encontraram, dentre 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada positivos para *A. actinomycetemcomitans*, nove positivos para clone de alta leucotoxicidade. Os indivíduos de sua amostra, entretanto, apresentavam variação de idade 14-19 anos, bem mais jovens do que os com periodontite deste estudo, que registraram variação de idade de 20-48 anos (grupo PAG).

A infecção pelo clone de alta leucotoxicidade (JP2) de *A. actinomycetemcomitans* pode ser o “gatilho” do início da patologia, não sendo este necessariamente requerido para a manutenção do processo da doença (HAUBEK *et al.*, 2008; HAUBEK *et al.*, 2009). Uma explicação pode ser a de que este afeta a tolerância imunológica, onde outras bactérias presentes no biofilme podem então sustentar e manter o processo inflamatório, que ao longo do tempo se manifesta clinicamente com perda de inserção ao redor dos dentes. O clone JP2 pode ainda estar continuamente presente abaixo do limite de detecção, mantendo atividade de reabsorção óssea. Assim, segundo esses autores, exames para detectar a presença de clones JP2 deveriam preferencialmente ser feitos em idade menor ou igual a 12 anos (HAUBEK *et al.*, 2009). Clones JP2 de *A. actinomycetemcomitans* produzem de dez a 20 vezes mais leucotoxina do que as cepas de mínima leucotoxicidade (BROGAN *et al.*, 1994) apesar de estas últimas também apresentarem produção de leucotoxina. Os indivíduos avaliados neste e em outros estudos (HAUBEK *et al.*, 1995; TINOCO *et al.*, 1997; MOMBELLI *et al.*, 1999; CONTRERAS *et al.*, 2000; HARASZTHY *et al.*, 2000; HAUBEK *et al.*, 2001), que apresentaram clones de mínima leucotoxicidade também exibiram destruição periodontal. Uma das limitações deste experimento ora relatado é que ele foi transversal, o que fez os pesquisadores terem uma amostra de conveniência daqueles que buscavam tratamento periodontal. Por esta característica do estudo, também não é possível determinar quando ocorreu a destruição periodontal que foi encontrada, se no passado ou em um período mais recente.



O grupo FAM foi constituído de 15 irmãos e 18 filhos dos portadores com periodontite agressiva. No que concerne a condição periodontal, 30,3% apresentaram periodontite agressiva, 36,3% periodontite crônica e 33,3% estavam periodontalmente saudáveis ou exibiam gengivite. Dentre eles, 12,2% estavam positivos para a presença de *A. actinomycetemcomitans*, sendo dez portadores de periodontite agressiva e 12 de crônica. Nos parentes saudáveis/gengivite, não foi encontrada presença desta bactéria. Apenas um (3%) exibiu clone de alta leucotoxicidade e três (9%) clones de mínima leucotoxicidade.

A periodontite agressiva mostra intensa agregação familiar (VAN DER VELDEN *et al.*, 1993; DE CARVALHO *et al.*, 2009) e, apesar de variações serem encontradas nos estudos que avaliam modelos de transmissão genética desta doença, há um consenso de que fatores genéticos com provável influência de fatores ambientais desenvolvam um papel nesta doença (DE CARVALHO *et al.*, 2009). Llorente e Griffiths (2006) examinaram componentes familiares portadores de periodontite agressiva e diagnosticaram 8% com periodontite agressiva, 39% com periodontite crônica e 53% estavam saudáveis ou com gengivite. Dogan *et al.* (2008) encontraram 38% de membros familiares de portadores de periodontite agressiva com alguma forma de doença periodontal, 19% com periodontite agressiva e 19% com periodontite crônica. Neste estudo a maioria dos componentes familiares apresentaram quadros de periodontite agressiva (30,3%) e crônica (36,3%), em porcentagens superiores às encontradas nos estudos citados. Segundo aqueles autores, pais e irmãos de um indivíduo com periodontite agressiva, positivo para *A. actinomycetemcomitans*, podem exibir maior susceptibilidade para doenças periodontais destrutivas (DOGAN *et al.*, 2008).

Outro ponto que pode ser apontado como importante na etiologia e disseminação familiar da doença é a transmissão de *A. actinomycetemcomitans* (PREUS *et al.*, 1994; ASIKAINEN; CHEN; SLOTS, 1996; TINOCO; SIVAKUMAR; PREUS, 1998; HARASZTHY *et al.*, 2000; DOGAN *et al.*, 2008). Avaliando famílias brasileiras de indivíduos com periodontite agressiva localizada, Tinoco *et al.* (1997) e Tinoco, Sivakumar e Preus (1998) observaram que 41,2% dos pais e 58% dos irmãos eram também colonizados por esta bactéria e que 5% apresentavam clones JP2. Ainda levantaram a hipótese de que, em algumas populações com o controle inadequado de higiene oral, torna-se comum a transmissão de *A. actinomycetemcomitans* (TINOCO *et al.*, 1997; TINOCO; SIVAKUMAR; PREUS, 1998). Dogan *et al.* (2008) observaram que 64% de membros familiares de portadores de periodontite agressiva

apresentaram a bactéria. Assim, ante a evidência de predisposição genética e transmissão bacteriana, exames preventivos em componentes familiares de portadores de periodontite agressiva poderiam diminuir o avanço de doenças periodontais destrutivas através do diagnóstico precoce.

Brown *et al.* (1996) observaram que 35% dos indivíduos jovens que apresentavam quadro de periodontite agressiva localizada progrediram para doença generalizada. Haraszthy *et al.* (2000) observaram que, em famílias de membros com periodontite agressiva localizada, os pais apresentavam quadro de periodontite crônica ou agressiva generalizada e sempre estavam colonizados com clones de mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans*. Foi ainda encontrado clone de mínima leucotoxicidade em crianças, semelhante ao achado nos pais (HARASZTHY *et al.*, 2000). Na amostra deste ensaio os indivíduos com periodontite agressiva quase que totalmente eram adultos com doença generalizada e exibiam clones de mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans*. Estes indivíduos podem, quando mais jovens, ter sido colonizados com clone de alta leucotoxicidade e apresentado um quadro de doença localizada, quando pode ter tido início a destruição periodontal. Ainda, indivíduos mais jovens exibem clones de alta leucotoxicidade, que se encontram ausentes em indivíduos mais velhos e alguns indivíduos são temporariamente portadores de clones de mínima e alta leucotoxicidade, o que pode ser consistente com a hipótese de que ocorre uma mudança na virulência do *A. actinomycetemcomitans* com o passar do tempo (HARASZTHY *et al.*, 2000; CORTELLI *et al.*, 2003; HAUBEK *et al.*, 2008).

Este estudo registrou pacientes com periodontite agressiva generalizada, estando, em pouco mais da metade, positivos para a presença de *A. actinomycetemcomitans*, exibindo quase que em sua totalidade clones de mínima leucotoxicidade. Sendo escassos os dados na literatura de pacientes com a doença periodontal agressiva generalizada, mais estudos se fazem necessários, a fim de investigar a progressão da doença periodontal agressiva, bem como dos tipos clonais de *A. actinomycetemcomitans*, que possam estar presentes nos diversos estágios da enfermidade.

## 7 CONCLUSÃO

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

- a presença de *A. actinomycetemcomitans* foi associada à condição clínica de periodontite agressiva;
- a maioria dos indivíduos com periodontite agressiva exibiu uma forma generalizada de doença e estavam positivos para clones de mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans*;
- indivíduos portadores de clones de alta leucotoxicidade apresentaram quadro de periodontite agressiva generalizada; e
- componentes familiares de portadores de periodontite agressiva apresentaram, em sua maioria, algum tipo de doença periodontal crônica ou agressiva.

## REFERÊNCIAS

- AAP. Parameter on chronic periodontitis with advanced loss of periodontal support. American Academy of Periodontology. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 5 Suppl., p. 856-858, May 2000a.
- AAP. Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. American Academy of Periodontology. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 5 Suppl., p. 853-855, May 2000b.
- AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v. 25, n. 4, p. 229-235, Dec. 1975.
- ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 11, n. 4, p. 266-273, Aug. 1996.
- 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.
- BAEHNI, P. C.; TSAI, C. C.; MCARTHUR, W. P.; HAMMOND, B. F.; SHENKER, B. J.; TAICHMAN, N. S. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. **Arch. Oral Biol.**, v. 26, n. 8, p. 671-676, 1981.
- BROGAN, J. M.; LALLY, E. T.; POULSEN, K.; KILIAN, M.; DEMUTH, D. R. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 2, p. 501-508, Feb. 1994.
- BROWN, L. J.; ALBANDAR, J. M.; BRUNELLE, J. A.; LOE, H. Early-onset periodontitis: progression of attachment loss during 6 years. **J. Periodontol.**, v. 67, n. 10, p. 968-975, Oct. 1996.
- BUENO, L. C.; MAYER, M. P.; DIRIENZO, J. M. Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 9, p. 998-1007, Sept. 1998.
- CONTRERAS, A.; RUSITANONTA, T.; CHEN, C.; WAGNER, W. G.; MICHALOWICZ, B. S.; SLOTS, J. Frequency of 530-bp deletion in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter region. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, n. 5, p. 338-340, Oct. 2000.

CORTELLI, S. C.; COSTA, F. O.; KAWAI, T.; AQUINO, D. R.; FRANCO, G. C.; OHARA, K.; ROMAN-TORRES, C. V.; CORTELLI, J. R. Diminished treatment response of periodontally diseased patients infected with the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 7, p. 2018-2025, July 2009.

CORTELLI, S. C.; JORGE, A. O.; CORTELLI, J. R.; JORDAN, S. F.; HARASZTHY, V. I. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 17, n. 2, p. 183-188, Apr./June 2003.

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.

DOGAN, B.; KIPALEV, A. S.; OKTE, E.; SULTAN, N.; ASIKAINEN, S. E. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 2, p. 307-315, Feb. 2008.

FLEMMIG, T. F. Periodontitis. **Ann. Periodontol.**, v. 4, n. 1, p. 32-38, Dec. 1999.

HARASZTHY, V. I.; HARIHARAN, G.; TINOCO, E. M.; CORTELLI, J. R.; LALLY, E. T.; DAVIS, E.; ZAMBON, J. J. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 6, p. 912-922, June 2000.

HAUBEK, D.; DIRIENZO, J. M.; TINOCO, E. M.; WESTERGAARD, J.; LOPEZ, N. J.; HUNG, C. P.; POULSEN, K.; KILIAN, M. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 12, p. 3037-3042, Dec. 1997.

HAUBEK, D.; ENNIBI, O. K.; ABDELLAOUI, L.; BENZARTI, N.; POULSEN, S. Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, n. 7, p. 657-660, July 2002.

HAUBEK, D.; ENNIBI, O. K.; POULSEN, K.; BENZARTI, N.; BAELUM, V. The highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and progression of periodontal attachment loss. **J. Dent. Res.**, v. 83, n. 10, p. 767-770, Oct. 2004.

HAUBEK, D.; ENNIBI, O. K.; POULSEN, K.; POULSEN, S.; BENZARTI, N.; KILIAN, M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Dent. Res.**, v. 80, n. 6, p. 1580-1583, June 2001.

HAUBEK, D.; ENNIBI, O. K.; POULSEN, K.; VAETH, M.; POULSEN, S.; KILIAN, M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. **Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 237-242, Jan. 2008.

HAUBEK, D.; ENNIBI, O. K.; VAETH, M.; POULSEN, S.; POULSEN, K. Stability of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **J. Dent. Res.**, v. 88, n. 9, p. 856-860, Sept. 2009.

HAUBEK, D.; HAVEMOSE-POULSEN, A.; WESTERGAARD, J. Aggressive periodontitis in a 16-year-old Ghanaian adolescent, the original source of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain HK1651 - a 10-year follow up. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 16, n. 5, p. 370-375, Sept. 2006.

HAUBEK, D.; POULSEN, K.; ASIKAINEN, S.; KILIAN, M. Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 2, p. 395-401, Feb. 1995.

HAUBEK, D.; POULSEN, K.; KILIAN, M. Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 6, p. 3080-3088, June 2007.

HAUBEK, D.; POULSEN, K.; WESTERGAARD, J.; DAHLÈN, G.; KILIAN, M. Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 6, p. 1576-1578, June 1996.

HAUBEK, D.; WESTERGAARD, J. Detection of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 14, n. 1, p. 41-48, Jan. 2004.

HÖGLUND, C. A.; SJODIN, B.; LAKIO, L.; PUSSINEN, P. J.; JOHANSSON, A.; CLAESSION, R. Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in young individuals: a 16-year clinical and microbiological follow-up study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 10, p. 815-822, Oct. 2009.

IBGE. **População total e respectiva distribuição percentual, por cor ou raça, segundo as Grandes Regiões, Unidades da Federação e Regiões Metropolitanas - 2006: Síntese de Indicadores sociais.** Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Indicadores\\_Sociais/Sintese\\_de\\_Indicadores\\_Sociais\\_2007/Tabelas](ftp://ftp.ibge.gov.br/Indicadores_Sociais/Sintese_de_Indicadores_Sociais_2007/Tabelas). Acesso em: 23 jul. 2008.

JOHANSSON, A.; HANSTROM, L.; KALFAS, S. Inhibition of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxicity by bacteria from the subgingival flora. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 218-225, Aug. 2000.

KAMMA, J. J.; NAKOU, M.; MANTI, F. A. Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 30, n. 1, p. 66-72, Jan. 1995.

- LALLY, E. T.; KIEBA, I.R.; DEMUTH, D. R.; ROSENBLOOM, J.; GOLUB, E. E.; TAICHMAN, N. S.; GIBSON, C. W. Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 159, n. 1, p. 256-262, Feb. 1989.
- LLORENTE, M. A.; GRIFFITHS, G. S. Periodontal status among relatives of aggressive periodontitis patients and reliability of family history report. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, n. 2, p. 121-125, Feb. 2006.
- LOPEZ, N. J.; MELLADO, J. C.; LEIGHTON, G. X. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 23, n. 2, p. 101-105, Feb. 1996.
- MOMBELLI, A.; GMÜR, R.; LANG, N. P.; CORBERT, E.; FREY, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, n. 8, p. 505-510, Aug. 1999.
- MULLER, H. P.; LANGE, D. E.; MULLER, R. F. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* recovery from extracrevicular locations of the mouth. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 8, n. 6, p. 344-348, Dec. 1993.
- PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C. M.; PENA, S. D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, n. 1, p. 177-182, Jan. 2003.
- PIMENTA, J. R.; ZUCCHERATO, L. W.; DEBES, A. A.; MASELLI, L.; SOARES, R. P.; MOURA-NETO, R. S.; ROCHA, J.; BYDŁOWSKI, S. P.; PENA, S. D. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. **Hum. Hered.**, v. 62, n. 4, p. 190-195, 2006.
- POULSEN, K.; ENNIBI, O. K.; HAUBEK, D. Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 10, p. 4829-4832, Oct. 2003.
- PREUS, H. R.; ZAMBON, J. J.; DUNFORD, R. G.; GENCO, R. J. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 65, n. 1, p. 2-7, Jan. 1994.
- REGO, R. O.; SPOLIDORIO, D. M.; SALVADOR, S. L.; CIRELLI, J. A. Transmission of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* between Brazilian women with severe chronic periodontitis and their children. **Braz. Dent. J.**, v. 18, n. 3, p. 220-224, 2007.
- RODENBURG, J. P.; VAN WINKELHOFF, A. J.; WINKEL, E. G.; GOENE, R. J.; ABBAS, F.; DE GRAFF, J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. **J Clin Periodontol**, v. 17, n. 6, p. 392-399, Jul. 1990.

- TINOCO, E. M. B.; STEVENS, R.; HAUBEK, D.; LAI, C. H.; BALACHANDRAN, S.; PREUS, H. Relationship of serotype, leukotoxin gene type and lysogeny in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to periodontal disease status. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 105, n. 4, p. 310-317, Aug. 1997.
- TINOCO, E. M.; SIVAKUMAR, M.; PREUS, H. R. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with localized juvenile periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 2, p. 99-105, Feb. 1998.
- TONETTI, M. S.; MOMBELLI, A. Early-onset periodontitis. **Ann. Periodontol.**, v. 4, n. 1, p. 39-53, Dec. 1999.
- 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. 683-690, Oct. 1993.
- WILSON, K. H.; BLITCHINGTON, R. B.; GREENE, R. C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 9, p. 1942-1946, Sept. 1990.
- WOLFF, L. F.; AEPPLI, D. M.; PIHLSTROM, B.; ANDERSON, L.; STOLTENBERG, J.; OSBORN, J.; HARDIE, N.; SHELBURNE, C.; FISCHER, G. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 20, n. 10, p. 699-706, Nov. 1993.
- ZAMBON, J. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 12, n. 1, p. 1-20, Jan. 1985.
- ZAMBON, J. J.; HARASZTHY, V. I. The laboratory diagnosis of periodontal infections. **Periodontol. 2000**, v. 7, n. p. 69-82, Feb. 1995.



## 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.

| <b>n</b> | <b>Dentes<br/>(média)</b> | <b>CCIC PS</b> | <b>CCIC NIC</b> |
|----------|---------------------------|----------------|-----------------|
| 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**

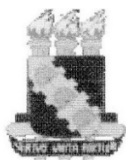
**NIC – Nível de inserção clínico**

## 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™<sup>4</sup> 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.

---

<sup>4</sup> BioRad Laboratories. Hercules, CA - USA

**ANEXO A – Protocolo do Comitê de Ética**

Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

**Of. N° 133/08**

**Fortaleza, 14 de março de 2008**

**Protocolo COMEPE n° 20/ 08**

**Pesquisador responsável:** Virginia Régia Souza da Silveira

**Dept°./Serviço:** Departamento de Odontologia/ UFC

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

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>. 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 n° 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

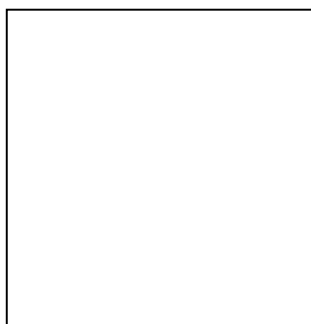
- 3- Apresenta como benefícios a detecção de doença periodontal e o encaminhamento para tratamento, se for detectada doença, para a clínica de Periodontia do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem.
- 4- Estou ciente de que serei esclarecido durante todo o decorrer da 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