



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

RICHELLE SOARES RODRIGUES

**PREVALÊNCIA DE *Porphyromonas gingivalis*, GENÓTIPO *fimA* II DE *Porphyromonas*
gingivalis e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EM INDIVÍDUOS COM
PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA**

FORTALEZA

2014

RICHELLE SOARES RODRIGUES

PREVALÊNCIA DE *Porphyromonas gingivalis*, GENÓTIPO *fimA* II DE *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA

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 em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Cító César Rêgo.

FORTALEZA

2014

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

R616p

Rodrigues, Richelle Soares.

Prevalência de *porphyromonas gingivalis*, genótipo *fima ii* de *porphyromonas gingivalis* e *aggregatibacter actinomycetemcomitans* em indivíduos com periodontite agressiva generalizada. /

Richelle Soares Rodrigues. – 2014.

42 f. : il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará; Centro de Ciências da Saúde; Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; Departamento de Odontologia; Programa de Pós-Graduação em Odontologia; Mestrado em Odontologia, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo.

1. Periodontite Agressiva. 2. *Porphyromonas gingivalis*. 3. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. I. Título.

CDD 617.632

RICHELLE SOARES RODRIGUES

PREVALÊNCIA DE *Porphyromonas gingivalis*, GENÓTIPO *fimA II* DE *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA

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 em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Sérgio Luís da Silva Pereira
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

Prof^a. Dr^a. Nádia Nadia Accioly Pinto Nogueira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais, pelo apoio, estímulo e amor constantes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Otávio Citó César Rêgo, pelos ensinamentos e apoio dedicados, por todas as oportunidades e pela postura sempre amistosa.

À amiga Virgínia Silveira, por toda a ajuda no aprendizado da metodologia e na realização desta pesquisa. Sou muito grata por todos os dias em que foi espontaneamente ao laboratório para me ajudar.

À Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly Pinto Nogueira e ao amigo de pós-graduação Jandenilson Alves Brito, pela ajuda no processo de aprendizado em biologia molecular.

Ao técnico do Laboratório de Pesquisa em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, Davi Queiroz, pela ajuda no decorrer dos experimentos.

Aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa.

A todos os amigos da turma de mestrado, em especial à Catarina Martins Tahim, por todo companheirismo no decorrer do curso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFC, em especial a coordenadora Dr^a Lidiany Karla Azevedo Rodrigues, pelo esforço para aprimorar o curso.

Às funcionárias da secretaria do PPGO pelos esclarecimentos e pela colaboração quando solicitadas.

À professora Dr^a Maria Mônica Studart Mendes Moreira, pela orientação clínica no decorrer do curso.

A todos os meus queridos, em especial aos meus pais Roberto Alves Rodrigues e Fátima Soares Rodrigues, pelo apoio indispensável para tornar essa realização possível, e ao meu namorado Felipe Fernandes Moreira, pela paciência e apoio.

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.

RESUMO

Porphyromonas gingivalis e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* são periodontopatógenos associados à periodontite agressiva. A fímbria, uma estrutura relacionada à adesão e à invasão de células, é um dos principais fatores de virulência de *P. gingivalis*. Baseado na sequência de nucleotídeos, seis genótipos(*fimA*) que codificam a fímbria principal dessas bactérias foram identificados, sendo o *fimA* II mais comumente relacionado à destruição periodontal. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de reação em cadeia da polimerase em amostras de placa subgingival dos sítios com maior profundidade de sondagem de pacientes com periodontite agressiva, a prevalência de *P. gingivalis*, do genótipo *fimA* II de *P. gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans*, assim como relacionar a presença desses patógenos ou genótipo à idade e aos parâmetros clínicos periodontais (índice de placa, índice de sangramento gengival, profundidade de sondagem e nível de inserção) encontrados nesses pacientes. Foram selecionados 45 pacientes com periodontite agressiva generalizada, com idade entre 15 e 40 anos. Nessa população, 64,4% apresentaram *P. gingivalis* e 28,8% apresentaram *A. actinomycetemcomitans* em sua microbiota subgingival. Dos pacientes positivos para *P. gingivalis*, 82,6% apresentaram o genótipo *fimA* II. Ao se relacionar a presença ou ausência das bactérias ou genótipo aos dados clínicos e idade, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o nível clínico de inserção do sítio coletado de pacientes com presença de *P. gingivalis* e seu genótipo *fimA* II quando comparados aos pacientes negativos para essa bactéria e genótipo, sendo a perda de inserção significativamente maior em pacientes que apresentaram *P. gingivalis* e em paciente com seu genótipo *fimA* II. Além disso, foi encontrada média de idade significativamente mais elevada em pacientes positivos para *P. gingivalis* que em pacientes negativos para essa bactéria. Concluiu-se, assim, que *P. gingivalis* e seu genótipo *fimA* tipo II estão presentes em alta prevalência em pacientes com periodontite agressiva generalizada, que *A. actinomycetemcomitans* está presente em menor proporção de indivíduos na população estudada e que *P. gingivalis* parece ser mais comumente encontrada em bolsas mais profundas e em indivíduos mais velhos.

Palavras-chave: Periodontite agressiva. *Porphyromonas gingivalis*. Fímbria. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

ABSTRACT

Porphyromonas gingivalis and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are periodontal pathogens associated with aggressive periodontitis. The fimbriae, a structure related to adhesion and invasion of cells, is one of the major virulence factors of *P. gingivalis*. Based on the nucleotide sequence, six genotypes(*fimA*) encoding the major fimbriae of these bacteria were identified, and the *fimA* II is the most commonly associated with periodontal destruction. The objective of this study was to evaluate, by polymerase chain reaction in subgingival plaque samples from sites with highest probing depth in patients with aggressive periodontitis, the prevalence of *P. gingivalis*, *P. gingivalis* genotype *fimA* II and *A. actinomycetemcomitans*, and relate the presence of these pathogens or genotype to age and clinical periodontal parameters (plaque index, gingival bleeding index, probing depth and clinical attachment level) in these patients. We selected 45 patients with generalized aggressive periodontitis, aged from 15 to 40 years. 64.4% of these patients harbored *P. gingivalis* and 28.8% harbored *A. actinomycetemcomitans* in their subgingival microbiota. In patients positive for *P. gingivalis*, 82.6 % presented the genotype *fimA* II. In relation to the presence or absence of bacteria or gene to clinical data and age, a statistically significant difference between clinical attachment level was observed in the selected sites of patients with the presence of *P. gingivalis* and its genotype *fimA* II when compared to patients negative for these bacteria and genotype, with periodontal loss significantly higher in patients harboring *P. gingivalis* and in patients harboring genotype *fimA* II. In addition, the average age in patients positives for *P. gingivalis* was significantly higher than in negative ones. It is therefore concluded that *P. gingivalis* and its genotype *fimA* II are present in high prevalence in patients with generalized aggressive periodontitis, *A. actinomycetemcomitans* is present in a smaller proportion of individuals in the studied population and *P. gingivalis* seems to be more commonly found in deeper sites and older individuals.

Keywords: Aggressive periodontitis. *Porphyromonas gingivalis*. Fimbriae. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
5 RESULTADOS	27
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICES	39
ANEXOS	40

1 INTRODUÇÃO

Periodontite agressiva engloba manifestações de periodontite de rápido início e progressão em pacientes sistemicamente saudáveis. Em geral, acomete indivíduos mais jovens e tem ocorrência mais rara e grave quando comparada a periodontite crônica, além de apresentar tendência à agregação familiar.^{1; 2} Essas peculiaridades sugerem a presença de uma microbiota altamente virulenta e/ou um alto nível de susceptibilidade do paciente para a doença, sendo realizados diversos estudos em busca de melhor entendimento sobre sua etiologia e patogênese.

Segundo a Academia Americana de Periodontologia⁴, periodontite agressiva pode ser classificada como localizada ou generalizada. Na periodontite agressiva localizada, há perda de inserção interproximal em pelo menos dois dentes permanentes, um dos quais primeiro molar, e o acometimento de não mais do que dois dentes além de incisivos e primeiros molares. Já na periodontite agressiva generalizada, a perda de inserção interproximal afeta pelo menos três dentes permanentes além de incisivos e primeiros molares. Ambas as formas acometendo indivíduos sistemicamente saudáveis e com rápida perda de inserção e destruição óssea.⁴

Essa patologia tem sido historicamente relacionada a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, principalmente em sua forma localizada, e, em algumas populações, tem sido relacionada a *P. gingivalis*, principalmente em sua forma generalizada.^{3; 4; 5; 6}

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é um cocobacilo Gram-negativo capnofílico consistentemente associado a pacientes com periodontite agressiva.^{4; 7} *Porphyromonas gingivalis* é um cocobacilo Gram-negativo anaeróbico estrito que tem sido associada a doenças periodontais, incluindo periodontite crônica^{8; 9; 10} e agressiva,^{4; 11; 12; 13} mas também pode ser encontrada em pacientes periodontalmente saudáveis.^{8; 14; 15} Essa bactéria apresenta diversidades genotípica e fenotípica, resultando em diferenças em sua virulência e em sua capacidade de indução de destruição periodontal.¹⁵

A virulência de *P. gingivalis* é consistentemente associada à presença de fímbrias, que são apêndices envolvidos na adesão celular. Fímbrias são as principais estruturas responsáveis pela aderência das bactérias a células epiteliais, fibroblastos, componentes salivares e colágeno, desempenhando importante papel na colonização e invasão dos tecidos periodontais.^{16; 17} A fímbria principal é codificada pelo genótipo *fimA*.^{8; 15; 18; 19; 20; 21} Baseado na sequência de nucleotídeos, seis genótipos *fimA* foram identificados: *fimA* I, Ib, II, III, IV e V.^{8; 22; 23; 24}

Inúmeros estudos tem relacionado maior prevalência do genótipo tipo II, seguido em geral dos tipo IV e Ib em pacientes com periodontite.^{8; 15; 18; 19; 20; 21}

Apesar de diversas pesquisas terem avaliado a diversidade genotípica do *fimA* em diferentes condições periodontais, apenas duas avaliaram especificamente a prevalência dos genótipos em pacientes com periodontite agressiva,^{6; 13} em que foi observada destacada associação do genótipo *fimA* II com essa doença em japoneses e chineses.

Variações microbiológicas em pacientes com periodontite agressiva, influenciadas pela etnia, localização geográfica e pela condição da população estudada, justificam a necessidade da realização de estudos em diferentes populações. Além disso, é importante avaliar a presença de periodontopatógenos relacionando-os ao comportamento clínico da doença, contribuindo assim para a identificação de indivíduos de risco. Dessa forma, buscou-se neste trabalho avaliar, por meio de reação em cadeia da polimerase, a prevalência de *P. gingivalis*, do genótipo *fimA* II de *P. gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans*, assim como relacionar a presença desses patógenos ou genótipo aos parâmetros clínicos em pacientes com periodontite agressiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Periodontite agressiva consiste em um tipo de doença periodontal que apresenta como características principais rápido início e progressão da destruição periodontal, acometimento de indivíduos sistemicamente saudáveis e agregação familiar. Essa patologia pode apresentar ainda características secundárias, não sendo encontradas em todos os pacientes, mas que, em geral, estão presentes. Entre as características secundárias relatadas, estão quantidade de biofilme inconsistente com a severidade da destruição periodontal, elevadas proporções de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e, em algumas populações, *Porphyromonas gingivalis*, anormalidades fagocitárias e presença de fenótipos de macrófagos hiperresponsivos.²

Porphyromonas gingivalis é um periodontopatógeno consistentemente associados a doenças periodontais, tendo sido encontrado em bolsas periodontais de pacientes com periodontite agressiva^{4; 11; 12; 13} e crônica.^{8; 9; 10} Essa bactéria também tem sido encontrada, apesar de em menor proporção, em indivíduos periodontalmente saudáveis,^{8; 14; 15} o que pode ser explicado devido a *P. gingivalis* apresentar diversidade genotípica e fenotípica, resultando em diferenças na indução de destruição periodontal.¹⁵ Entre os fatores de virulência de *P. gingivalis*, as fímbrias são a principal estrutura responsável pela aderência das bactérias a células epiteliais, fibroblastos, componentes salivares e colágeno, desempenhando importante papel na colonização e invasão dos tecidos periodontais.¹⁶ A fímbria principal é codificada pelo genótipo *fimA*, cujas variações alélicas estão relacionadas a diferentes condições periodontais.^{8; 15; 18; 19; 21}

O primeiro estudo a avaliar a prevalência dos genótipos *fimA* de *P. gingivalis* em pacientes com periodontite é de 1999²². Amano e colaboradores avaliaram amostras de placa subgingival e de saliva de 93 japoneses com bolsas periodontais maior ou igual a 4 mm quanto a presença dos genótipos *fimA* dos tipo I, II, III e IV, através de reação em cadeia da polimerase(PCR). Desses pacientes, 78,5% apresentam *P. gingivalis* em sua microbiota, sendo o genótipo *fimA* mais prevalente o tipo II(58,9%), seguido do tipo IV(12,3%) (Dados completos presentes no quadro 1). Além disso, 6,8% das amostras não foram correlacionadas a nenhum genótipo estudado. Em continuação a essa pesquisa, Nakagawa e colaboradores, em 2000,²⁴ caracterizaram um novo genótipo *fimA* nas amostras não tipáveis. Nesse estudo, o genótipo *fimA* V foi caracterizado e encontrado, isolado ou combinado a demais genótipos, em 16,4% das amostras de japoneses com periodontite.

Em busca de avaliar as diferenças na prevalência dos genótipos em pacientes periodontalmente saudáveis e com periodontite, Amano e colaboradores, em 2000,⁸ realizaram PCR para os genótipos I a V em biofilme dental de 380 japoneses periodontalmente saudáveis e 139 pacientes com periodontite. *P. gingivalis* foi detectada em 36,3% dos indivíduos saudáveis e em 87,1% dos pacientes com periodontite. Dentre os indivíduos sem periodontite, o tipo mais prevalente foi *fimA* I(76,1%), seguido do tipo V(29,7%), enquanto os pacientes com doença periodontal apresentaram maior prevalência do tipo II (66,1%), seguida pelo tipo IV(28,9%), sendo encontrado OR 44.44 para periodontite na presença do genótipo tipo II e OR 13,87 para o genótipo tipo IV na população de japoneses estudada. Esses achados indicaram que existem cepas de *P. gingivalis* relacionadas com doença periodontal, mas também existem cepas associadas com saúde e que a variação clonal desses microorganismos pode influenciar no perfil periodontal.

Em 2002, o grupo de Nakagawa²³ sequenciou uma nova variante do genótipo *fimA*, designado como tipo Ib, passando ao conhecimento de 6 diferentes genótipos *fimA* de *P. gingivalis*(Tipo I, II, III, IV, V e Ib). A sequência de nucleótidos do genótipo mostrou uma homologia de 97,1% com a de tipo I, indicando-o como uma variante clonal do tipo I. Microorganismos do tipo Ib foram detectados em 13,5% dos pacientes estudados com periodontite e em 2,9% dos adultos periodontalmente saudáveis. No citado estudo, observou-se forte relação entre periodontite e os genótipos *fimA* II (OR 77,8), IV (OR 7,54) e Ib (OR 6,51). Além disso, microrganismos do tipo Ib também foram relacionados com periodontite em pacientes com síndrome de Down (OR 1,91) e em pacientes com deficiência mental (OR 4,00). Esses resultados sugeriram que *P. gingivalis fimA* Ib também está associada com doença periodontal, similarmente aos microrganismos com genótipos II e IV.

Nos anos subsequentes, diversos estudos foram realizados objetivando relacionar a presença dos genótipos *fimA* de *P. gingivalis* a diferentes condições periodontais. Esses estudos e seus resultados encontram-se listados no quadro 1. De forma geral, os genótipos do tipo II, seguidos do tipo IV e Ib, são os mais prevalentes em indivíduos com perda de inserção periodontal, enquanto o tipo I é comumente relacionado à saúde periodontal.

Como já mencionado, a periodontite agressiva tem sido historicamente relacionada a *A. actinomycetemcomitans*, principalmente em sua forma localizada, mas, em algumas populações, tem sido relacionada a *P. gingivalis*, principalmente em sua forma generalizada.^{3; 4; 5; 6} Apesar da

existência de diversos estudos que avaliam a prevalência dos genótipos *fimA* dessa bactéria em diferentes condições periodontais, poucos procuraram avaliar especificamente a prevalência desses genótipos em pacientes com periodontite agressiva(Quadro 2). No Brasil, Missailidis e colaboradores¹⁵ avaliaram a ocorrência dos genótipos em pacientes sem perda de inserção e com periodontite crônica e agressiva. Nesse trabalho, foi encontrada *P. gingivalis* em 86,7% dos pacientes com periodontite agressiva, mostrando-se estatisticamente mais prevalente nesses pacientes que em indivíduos saudáveis e sem diferença em relação aos pacientes com periodontite crônica, mas os dados referentes ao genótipo *fimA* não foram avaliados separadamente para cada doença.

Até o presente momento, apenas dois estudos avaliaram a prevalência dos genótipos *fimA* de *P. gingivalis* especificamente na periodontite agressiva. Miura *et al.*¹³ e Feng *et al.*⁶ investigaram essa associação em indivíduos japoneses e chineses, respectivamente (Quadro 2). Miura e colaboradores¹³, em 2005, avaliaram 18 japoneses com periodontite agressiva, encontrando uma maior prevalência de *P. gingivalis* em pacientes com periodontite agressiva que em indivíduos periodontalmente saudáveis (79,8% versus 16,8%). O genótipo *fimA* II mostrou-se mais prevalente nos indivíduos com periodontite agressiva, seguido dos tipos Ib e I. Quase metade dos pacientes com periodontite agressiva possuíam genótipo *fimA* II. Por outro lado, nos indivíduos sem comprometimento periodontal, a prevalência de *P. gingivalis fimA* I foi significativamente superior. Quando comparados os níveis quantitativos de *P. gingivalis* do tipo I em indivíduos saudáveis e com periodontite agressiva, foram observados níveis mais elevados nos indivíduos com periodontite agressiva. Além disso, foi observada uma coexistência de *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythensis* nos sítios com *P. gingivalis fimA* II significativamente mais elevada. Esses autores sugeriram, assim, forte associação entre *P. gingivalis fimA* II e periodontite agressiva, e que o genótipo do tipo II pode facilitar a aderência de outras bactérias e contribuir para a formação de biofilme, enquanto o aumento quantitativo de *P. gingivalis fimA* I pode aumentar a sua patogenicidade.

Mais recentemente, em 2014, Feng e colaboradores⁶ realizaram pesquisa semelhante em 81 pacientes chineses com periodontite agressiva. Praticamente todos os pacientes com periodontite agressiva apresentavam *P. gingivalis* em sua microbiota. De forma semelhante ao estudo anteriormente citado, o genótipo *fimA* II mostrou-se significativamente mais prevalente em pacientes com periodontite agressiva localizada e generalizada que em indivíduos saudáveis,

enquanto o genótipo tipo I apresentou-se mais prevalente em indivíduos sem comprometimento periodontal.

Dessa forma, tendo em vista os diversos estudos citados, *P. gingivalis* tem sido encontrada em pacientes doença periodontal, e o genótipo *fimA* II é o mais comumente encontrado em pacientes com periodontite tanto crônica quanto agressiva. Entretanto, ainda há poucos estudos que relacionam os genótipos em pacientes com periodontite agressiva e até o presente momento não há dados publicados sobre essa relação em indivíduos brasileiros com essa patologia.

Quadro 1. Estudos que avaliam genótipos *fimA* de *Porphyromonas gingivalis* em diferentes condições periodontais. (Continuação nas páginas seguintes)

AUTOR (ANO)	AMOSTRA	CONDIÇÃO PERIODONTAL	MÉTODO	PRINCIPAIS ACHADOS*
Amano <i>et al.</i> (1999) ²²	Biofilme subgingival e saliva de 93 indivíduos japoneses (19-79 anos)	Periodontite (PS \geq 4 mm)	PCR	- <i>Pg</i> +: 78,5% - Genótipos tipo II:58,9% > tipo IV: 12,3% > tipo III: 6,8% > I e II: 6,8% > I: 5,4% II e IV: 2,7% 6,8% não tipável - <i>Pg</i> com <i>fimA</i> tipo II foi detectada mais frequentemente em bolsas periodontais profundas(PS \geq 8 mm) (p< 0,05)
Nakagawa <i>et al.</i> (2000) ²⁴	Biofilme subgingival e saliva de 93 indivíduos japoneses (19-79 anos) (Mesmas amostras do estudo citado acima – com o objetivo de identificar novo genótipo)	Periodontite (PS \geq 4 mm)	Southern blot (Caracterização de nova variante do tipo V) PCR	- <i>fimA</i> V: 16,4%
Amano <i>et al.</i> (2000) ⁸	Biofilme dental de 519 japoneses (30-70 anos)	Saúde periodontal (380) Periodontite(139) (PS > 5 mm)	PCR	Saúde periodontal - <i>Pg</i> +: 36,3% - Genótipos tipo I:76,1% > tipo V: 29,7% > tipo II: 9,4% > III: 7,2% > IV: 6,5% Periodontite - <i>Pg</i> +: 87,1% - Genótipos tipo II:66,1% > tipo IV: 28,9% > tipo V: 17,4% > I: 6,7% > III: 5,8% - OR(tipoII) 44,44 - OR(tipo IV) 13,87
Amano <i>et al.</i> (2001) ²⁵	Biofilme subgingival de 67 adultos jovens japoneses com Síndrome de Down(SD) e 41 indivíduos com deficiência mental(DM) (20-35anos)	Gengivite Periodontite (PS \geq 3,5 mm)	PCR	Gengivite SD: - <i>Pg</i> +:50% - Genótipos tipo I: 87,5% > tipo II: 14,3% > tipo III, IV e V: 0% DM: - <i>Pg</i> +:67,7% - Genótipos tipo I: 57,1% > tipo III: 33,1% > tipo II: 23,8% > V: 9,6% > IV: 0%

				<p>Periodontite SD: - <i>Pg+</i>: 76,9% - Genótipos tipo II: 66,7% > tipo I: 40% > tipo IV: 13,4% > III: 3,3% = V: 3,3% DM: - <i>Pg+</i>: 80% - Genótipos tipo II: 87,5% > tipo I: 37,5% > tipo III: 12,5% > IV e V: 0%</p>
Nakagawa <i>et al.</i> (2002) ²³	Biofilme dental de 590 japoneses (30-70anos)	Saúde periodontal (380) Periodontite (210) (PS > 5 mm)	PCR	<p>Saúde periodontal - <i>Pg+</i>: 36,3% - Genótipos tipo I: 69,9% > tipo V: 22,8% > tipo III: 7,2% > IV: 6,5% > II: 3,6% = Ib: 3,6%</p>
				<p>Periodontite - <i>Pg+</i>: 91,4% - Genótipos tipo II: 52,6% > tipo IV: 19,7% > tipo Ib: 19,2 > V: 11,9% > I: 7,2% > III: 6,7%</p>
Beikler <i>et al.</i> (2003) ¹⁹	Biofilme subgingival (<i>pool</i>) de 203 caucasianos	Periodontite crônica ou agressiva (moderada a severa)	PCR Análise de restrição	<p>- <i>Pg+</i>: 50,25% - Genótipos tipo II: 40,2% > I: 25,5% > IV: 20,6% > III: 4,9% > V: 3,9% 6,9% não tipável - Não houve diferença estatística entre a prevalência dos genótipos de <i>fimA</i> relacionada a severidade da doença periodontal</p>
Asano <i>et al.</i> (2003) ²⁶	Biofilme subgingival de 14 pacientes com periodontite e respectivos cônjuges(ambos <i>Pg+</i>) (30-70 anos); Biofilme subgingival de 32 japoneses não casados com periodontite e <i>Pg+</i> (24 -70 anos)	Periodontite (pelo menos 4 sítios com PS > 4 mm e pelo menos 1 defeito intraósseo)	Padrão de eletroforese em campo pulsado	<p>- Padrões de cepas idênticos: 42,8% dos casais (6 casais) - Casais com padrões de cepas idênticos: Genótipo tipo II: 83,3% > V: 16,7% - Casais com padrões de cepas diferentes: Genótipos tipo II: 62,5% > V: 12,5% = I: 12,5% > IV: 6,2% > III: 0% - Periodontite (não casados): Genótipo tipo II: 46,8% > IV: 15,6% > I: 9,3% > III: 6,3% = V: 6,3%</p>
			PCR	
Van der Ploeg <i>et al.</i> (2004) ¹⁰	Biofilme dental de 50 europeus: 17 com periodontite crônica (38 - 81 anos); 33 periodontalmente saudáveis (19 - 46 anos)	Saúde periodontal Periodontite crônica (\geq 4 sítios com PS e perda de inserção \geq 4 mm)	PCR em tempo real Imunofluorescência	<p>- <i>Pg+</i>: 71% das amostras de pacientes com periodontite crônica e 9% das amostras de indivíduos saudáveis. - 73% das amostras positivas para <i>P. gingivalis</i> apresentavam múltiplos genótipos <i>fimA</i>. - Genótipo II predominou em 60% das amostras. - Genótipo IV apresentou prevalência similar ao do genótipo II (73%), mas predominou em apenas 20% das amostras.</p>

Missailidis <i>et al.</i> (2004) ¹⁵	Biofilme subgengival de 102 brasileiros (14-75 anos)	Sem perda de inserção: Saudáveis(25) Gengivite(20) Com perda de inserção: Periodontite crônica(42) Periodontite agressiva(15)	PCR	Sem perda de inserção: - <i>Pg</i> +: Saudáveis 8%; Gengivite 30% - Genótipos tipo IV: 50% > tipo I: 25% = tipo II: 25% > Ib: 0% = III: 0% = V: 0%
				Com perda de inserção: <i>Pg</i> +: Periodontite crônica 90,5%; Agressiva 86,7% - Genótipos tipo II: 47% > tipo Ib: 27,4% > tipo III: 11,7% = I: 11,7% > IV: 5,8% > V: 0%; Não tipável: 17.8%
Fujise <i>et al.</i> (2005) ²⁷	Biofilme subgengival de 160 sítios profundos de japoneses (PS \geq 4 mm), com sangramento à sondagem e <i>Pg</i> + antes e após raspagem e alisamento radicular (\geq 35anos)	Periodontite crônica (reabsorção óssea radiográfica generalizada)	PCR	- Baseline: maior frequência de sítios positivos para <i>fimA</i> tipo II do que para os tipos Ib e I. - Após tratamento: sítios inicialmente positivos para <i>fimA</i> tipo I apresentaram uma maior frequência de sangramento à sondagem persistente após o tratamento do que os sítios negativos para <i>fimA</i> tipo I (51,6% <i>versus</i> 27.9%)
Tamura <i>et al.</i> (2005) ¹⁸	650 amostras de saliva de 464 crianças e adolescentes japoneses (3 - 18 anos)	Gengivite	PCR	- <i>Pg</i> +: 3,23% (15) das crianças e adolescentes analisadas foram positivas para <i>Pg</i> . Todas apresentavam quadro de gengivite e estavam na faixa etária de 6 anos e 7 meses a 16 anos e 7 meses. - Os genótipos I, IV, III e Ib foram detectados em 4, 3, 2 e 1 indivíduo, respectivamente. Cinco indivíduos apresentaram genótipos não identificados. O genótipo II não foi detectado.
Akiyama <i>et al.</i> (2006) ²¹	450 amostras de biofilme subgengival de 75 japoneses epiléticos (10-35 anos) em uso de fenitoína	Crescimento gengival induzido por fenitoína classificado de acordo com a PS: sem crescimento (PS \leq 3 mm), moderado (PS entre 3-5 mm) e severo (PS > 5 mm)	PCR convencional PCR em tempo real	- Genótipo <i>fimA</i> tipo II foi significativamente mais prevalente nos casos moderados e severos(26.7% e 40.5%, respectivamente) - Genótipo <i>fimA</i> tipo IV mais prevalente em sítios sem crescimento(38,2%)
Davila-Perez <i>et al.</i> (2007) ²⁸	Biofilme subgengival de 75 mexicanos colonizados por <i>Pg</i> : 25 sem diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e sem periodontite; 25 sem DMT2 e com periodontite; 25 com DMT2 e com periodontite	Periodontite (perda de inserção e PS > 5 mm em pelo menos 10 sítios)	PCR	- Sem DMT2 e sem periodontite: <i>fimA</i> tipo I: 80% > Ib: 40% > II: 36% > IV: 16% > III: 8% > V: 4% - Sem DMT2 e com periodontite: <i>fimA</i> tipo Ib: 56% > I: 52% > II: 28% > IV: 8% > III: 4% > V: 0% - Com DMT2 e com periodontite: <i>fimA</i> tipo I: 56% > Ib: 40% > III: 24% > V: 8% > IV: 0%

Zhao <i>et al.</i> (2007) ¹⁴	Biofilme subgengival de 251 chineses (25-75 anos): 115 com periodontite crônica e 136 com saúde periodontal	Saúde periodontal Periodontite crônica (PS > 4 mm e pelo menos 16 dentes)	PCR	Saúde periodontal - <i>Pg</i> +: 22,1% - Genótipo <i>fimA</i> tipo I: 66,7% > V: 16,7% > III: 10% > IV: 6,7% = II: 6,7% Periodontite - <i>Pg</i> +: 81,7% - Genótipo <i>fimA</i> tipo II: 43,6% > IV: 30,9% > Ib: 20,4% > I: 17,1% > III: 15% > V: 4,3% - OR(tipoII) 36,62 - OR(tipo IV) 22,86 - OR(tipo Ib) 13,26
Teixeira <i>et al.</i> (2009) ²⁹	Biofilme subgengival de 168 sítios com diferentes profundidades de sondagem (≤3 mm, 4-6 mm e ≥7 mm) de 20 indivíduos brasileiros fumantes (30-52 anos)	Periodontite Crônica (pelo menos um sítio não contíguo com PS entre 5 e 7 mm e perda de inserção clínica entre 5 e 10 mm)	PCR em tempo real	- <i>Pg</i> e genótipo <i>fimA</i> tipo IV foram detectados em pelo menos 1 sítio em todos os indivíduos. O genótipo <i>fimA</i> tipo II foi detectado em 90% dos indivíduos. - <i>Pg</i> +: 90,5% dos sítios - Genótipo <i>fimA</i> tipo IV: 69,6% > II: 28% dos sítios - Baixa proporção dos níveis dos genótipos em relação ao total de <i>Pg</i> (IV: 13,7%, II: 2,6%) - Ausência de diferenças na prevalência de <i>Pg</i> e genótipos tipo II e IV e na proporção dos genótipos entre as profundidades de sondagem - Maiores níveis de <i>Pg</i> em bolsas profundas (PS ≥ 7 mm), - Ausência de diferença significativa nos níveis do genótipo tipo II entre as profundidades de sondagem - Aumento significativo dos níveis do genótipo tipo IV com o aumento da profundidade de sondagem
Hayashi <i>et al.</i> (2012) ³⁰	Amostras de biofilme supragengival de todos os dentes de 400 crianças japonesas (2-15 anos)	Saúde gengival (134) Gengivite (239) Periodontite crônica (27) (perda de inserção > 3 mm em pelo menos 4 dentes)	PCR	Saúde gengival - <i>Pg</i> +: 1,5% - Genótipo <i>fimA</i> tipo II: 100% > Ib: 50% > I: 0% = IV: 0% = III: 0% = V: 0% Gengivite - <i>Pg</i> +: 10% - OR(<i>Pg</i>) 7,4 - Genótipo <i>fimA</i> tipo II: 50,1% > IV: 33,3% > Ib: 20,9% > III: 8,3% > I: 0% = V: 0% (Não tipável: 8,3%) Periodontite - <i>Pg</i> +: 29,6% - OR(<i>Pg</i>) 27,8 - Genótipo <i>fimA</i> tipo II: 62,5% > IV: 37,5% = Ib: 37,5% > III: 0% = I: 0% = V: 0% (Não tipável: 5,9%)

Puig-Silla <i>et al.</i> (2012) ³¹	Biofilme subgingival de 85 espanhóis (25-50 anos)	Saúde gengival(37) Gengivite(16) Periodontite crônica(33) (PS >5 mm e perda de inserção ≥ 2 mm em pelo menos 4 sítios)	PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Saúde gengival <i>Pg+</i>: 27% - Gengivite <i>Pg+</i>: 37,5% - Periodontite <i>Pg+</i>: 66,7% - Genótipos <i>fimA</i> tipo II(39.4%) e tipo Ib(12.1%) encontrados em porcentagem significativamente maior em pacientes com periodontite - Genótipo tipo IV significativamente mais prevalente em pacientes com índice de sangramento > 30%
Fabrizi <i>et al.</i> (2013) ³²	224 amostras de biofilme subgingival de 65 espanhóis <i>Pg+</i>	Saúde periodontal (15 pacientes e 66 amostras) Periodontite crônica ou agressiva (50 pacientes e 158 amostras) (classificados de acordo com Armitage GC, 1999)	PCR	<p>Saúde periodontal</p> <ul style="list-style-type: none"> - Genótipo tipo II: 34,8% > I: 27,3% > Ib: 18,2% > IV: 15,2% > III: 4,5% > V: 0% - Genótipo tipo I significativamente mais prevalente nos indivíduos sem periodontite que indivíduos com periodontite (27,3% versus 8,2%) <p>Periodontite</p> <ul style="list-style-type: none"> - Genótipo tipo II: 57,6% > IV: 13,9% > Ib: 13,3% > I: 8,2% > III: 3,8% > V: 3,2% - Genótipos tipo II e IV significativamente mais prevalente que tipo I nesses indivíduos

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PS- Profundidade de sondagem

Pg- *Porphyromonas gingivalis*

fimA- genótipo de *Porphyromonas gingivalis*

*As porcentagens descritas são referentes aos genótipos encontrados de forma isolada ou combinada a demais genótipos.

Quadro 2. Estudos que avaliam genótipos *fimA* de *Porphyromonas gingivalis* especificamente em pacientes com periodontite agressiva.

AUTOR (ANO)	AMOSTRA	CONDIÇÃO PERIODONTAL	MÉTODO	PRINCIPAIS ACHADOS*
Miura <i>et al.</i> (2005) ¹³	Biofilme subgengival de 40 japoneses periodontalmente saudáveis(19-31 anos) e com periodontite agressiva(19-34 anos)	Saúde periodontal(22) Periodontite agressiva(18) (destruição periodontal severa e vários sítios com NIC \geq 5 mm)	PCR em tempo real	Saudáveis - <i>Pg</i> +: 16,8% - Genótipos tipo I: 100% > tipo Ib: 0% = tipo Ib: 0% = tipo II: 0% = tipo III: 0% = tipo IV: 0% = tipo V: 0% Periodontite agressiva - <i>Pg</i> +: 79,8% - Genótipos tipo II: 40,5% > tipo Ib: 23,8% > tipo I: 23% > III: 7,9% > V: 2,4% > IV: 0% - A quantidade de <i>Pg</i> foi significativamente maior em sítios com <i>fimA</i> tipo I do que em sítios com tipo II ou Ib
Feng <i>et al.</i> (2014) ⁶	Saliva e amostras de placa subgengival de 115 chineses	Saúde periodontal(34) Periodontite agressiva localizada (25) Periodontite agressiva generalizada (56) (classificados de acordo com Armitage GC, 1999)	PCR	- Saudáveis <i>Pg</i> +: 44.1% - Periodontite agressiva localizada <i>Pg</i> +: 100% - Periodontite agressiva generalizada <i>Pg</i> +: 98.2% - Genótipo tipo II significativamente mais prevalente em pacientes com periodontite agressiva localizada(52%) e generalizada(47,3%) que em indivíduos saudáveis(11,1%) - Genótipo tipo I significativamente mais prevalente em indivíduos saudáveis(66,7%) que em pacientes com periodontite agressiva localizada(16%) e generalizada(29,1%)

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PS- Profundidade de sondagem

Pg- *Porphyromonas gingivalis*

fimA- genótipo de *Porphyromonas gingivalis*

*As porcentagens descritas são referentes aos genótipos encontrados de forma isolada ou combinada a demais genótipos.

3 OBJETIVOS

- Detectar a prevalência de *P. gingivalis*, do genótipo *fimA* II de *P. gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos com periodontite agressiva generalizada.
- Relacionar a presença de *P. gingivalis*, do genótipo *fimA* II de *P. gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans* entre si e com a idade e os parâmetros clínicos periodontais de pacientes com periodontite agressiva generalizada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Seleção da Amostra

Este estudo foi realizado a partir da seleção de 45 pacientes com periodontite agressiva generalizada. Os participantes foram selecionados dentre os que procuram atendimento na Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará e nos Cursos de Especialização em Periodontia da Associação Brasileira de Odontologia-Ceará e da Academia Cearense de Odontologia.

Periodontite agressiva generalizada foi classificada de acordo com os critérios sugeridos pela Academia Americana de Periodontia²: perda de inserção interproximal generalizada afetando 3 dentes permanentes além de incisivos e primeiros molares, em indivíduos sistemicamente saudáveis e com rápida perda de inserção e destruição óssea. Além disso, para a inclusão no estudo, o paciente deveria apresentar pelo menos 20 dentes excluindo terceiros molares, dentre eles no mínimo três primeiros molares e cinco incisivos, e ter idade entre 12 e 40 anos.

Os indivíduos foram selecionados independente de sexo ou etnia. Todos não poderiam ter recebido tratamento periodontal nos últimos seis meses, antibioticoterapia nos últimos três meses, apresentar doenças periodontais agudas, alterações sistêmicas que interfiram nas condições periodontais, utilizar medicamentos associados ao crescimento gengival, anticoncepcionais ou estar em períodos de gravidez ou lactação.

O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (ANEXO A). Todos os participantes foram informados sobre os propósitos do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

Procedimentos Clínicos

O exame clínico foi realizado em todos os dentes presentes erupcionados com exceção de terceiros molares e consistiu na avaliação dos seguintes parâmetros:

- Índice de placa³³ - 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 de sangramento gengival³³ - presença de sangramento marginal por até dez segundos após a penetração da sonda periodontal 0,5 mm no sulco gengival, nas faces vestibular, palatina ou lingual, mesial e distal, e o índice determinado pela porcentagem das faces sangrantes em relação a todas as faces presentes;
- Profundidade de sondagem (mm) - valor obtido com base na margem gengival até o fundo do sítio periodontal em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual);
- Nível clínico de inserção (mm) - valor obtido da junção cimento-esmalte até o fundo do sítio periodontal em seis sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual e disto-lingual)

O exame clínico periodontal foi realizado por um único examinador previamente calibrado (Apêndice A), com a utilização da sonda periodontal PCP-UNC 15^γ.

Procedimentos Microbiológicos

Coleta das Amostras

Amostras de placa bacteriana subgengival foram coletadas com cones de papel estéreis^σ (tamanho 35), através da inserção de dois cones no sítio escolhido, por 20 segundos. Foi selecionado o sítio proximal com maior profundidade de sondagem e maior perda de inserção de dentes molares e incisivos, tendo sido essa a amostra representativa de cada paciente.

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 CaCl₂.2H₂O em 1000ml H₂O) e acondicionadas sob temperatura de – 80°C, até posterior manipulação. A avaliação microbiológica foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

^γ Trinity Indústria e Comércio Ltda., São Paulo-SP

^σ DENTSPLY Ind. e Com. Ltda.- Rio de Janeiro, Brasil.

Avaliação Microbiológica

Inicialmente, as amostras foram avaliadas através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) quanto à presença de *P. gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans*. Quando a presença de *P. gingivalis* foi detectada, as amostras foram submetidas à realização de PCR para o genótipo *fimA* II de *P. gingivalis*.

Reação em Cadeia da Polimerase

As amostras de placa subgingival coletadas foram previamente preparadas com kit InstaGene Purification Matrix™ para a extração do DNA, seguindo-se o seguinte protocolo: as amostras foram homogeneizadas em um agitador de tubos em máxima velocidade por 1 minuto; 200 µL da amostra foram transferidos para um novo tubo e centrifugados (10 minutos/12.000 rpm); removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se 200 µL do matrix do InstaGene ao pellet, seguido por incubação à 56 °C por 30 minutos, agitação por 10 segundos e incubados novamente por 8 minutos a 100°C; os tubos foram novamente agitados por 10 segundos e centrifugados (3 minutos/12.000 rpm), obtendo-se sobrenadante contendo o DNA extraído.

Para a realização da PCR, alíquotas com 20µL do sobrenadante foram adicionados a 30 µL de mix de reagentes para PCR (tampão para PCR[◇], 25 µM MgCl₂[◇], 0,2 µM de dNTP Mix[◇], 1,25 U de *Taq* polimerase[◇] e volume correspondente a 100 ng de cada *primer*[‡]), obtendo-se 50 µL de volume final.

Os *primers* utilizados e a região que amplificam estão dispostos na Tabela 1. A cada reação, amostras de água foram também analisadas como controle negativo, enquanto amostras sabidamente positivas para a bactéria ou genótipo foram utilizadas como controle positivo. Além disso, foi utilizado marcador de peso molecular[‡] para comparação com o peso molecular dos fragmentos de DNA amplificados. A amplificação foi realizada em um termociclador,[▽] utilizando-se os ciclos descritos na Tabela 2. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% para identificação de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, e 2% para o genótipo *fimA* tipo II, e corados com SYBR® Safe[‡]. Os

[◇] Promega Corporation. Madison – WI, USA.

[‡] Invitrogen Corporation. São Paulo – SP, Brasil.

[▽] Biocycler, Biosystems. Curitiba – PR, Brasil.

[™] BioRad Laboratories. Hercules, CA - USA

géis foram fotografados^γ em transiluminador de luz ultra-violeta^ο e então foi analisada a presença de bandas fluorescentes que evidenciam a presença dos microrganismos e do genótipo estudados (exemplos de gel presentes no ANEXO C).

Análise Estatística

Foi realizado o teste Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade dos dados. Em seguida, foi realizado o teste *t* não pareado (quando os dados apresentaram normalidade) ou o teste de Mann-Whitney (quando os dados não apresentaram normalidade) para comparação dos dados encontrados em pacientes positivos ou negativos para cada bactéria ou genótipo. Foi também realizado o teste de Fisher para avaliar a associação entre a presença das bactérias ou genótipos entre si. Para a análise, foi utilizado o *software* GraphPad InStat 3. O nível de significância adotado foi de 5%.

Tabela 1 – Sequência de *primers* utilizados no estudo.

Microorganismo/Genótipo	Sequência (5' - 3')	Região amplificada (em pares de bases)	Referência
<i>P. gingivalis</i>	TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC	197	Tran e Rudney, 1996. ³⁴
Genótipo <i>fimA</i> II	ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	257	Amano <i>et al.</i> , 1999. ²²
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	637	Ashimoto <i>et al.</i> , 1996. ³⁵

^γ Cibershot Sony H5 – Sony Electronics – Pittsburg, PA - EUA

^ο ImageQuant 100 UV - GE Healthcare – Waukesha, WI - EUA

Tabela 2 – Ciclos utilizados para amplificação em termociclador.

Microorganismo/Genótipo	Sequência (5' - 3')	Referência
<i>P. gingivalis</i>	Ciclo inicial a 95°C por 5 minutos 30 ciclos a 94°C por 30 segundos 58°C por 30 segundos 72°C por 30 segundos Extensão final a 72°C por 7 minutos	Amano <i>et al.</i> , 1999. ²²
Genótipo <i>fimA</i> II	Ciclo inicial a 95°C por 5 minutos 35 ciclos a 94°C por 30 segundos 58°C por 30 segundos 72°C por 30 segundos Extensão final a 72°C por 7 minutos	Amano <i>et al.</i> , 2000. ⁸
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Ciclo inicial a 94°C por 10 minutos 30 ciclos a 96°C por 30 segundos 55°C por 30 segundos 72°C por 30 segundos Extensão final a 72°C por 10 minutos	Haraszthy <i>et al.</i> , 2000. ³⁶

5 RESULTADOS

A amostra estudada foi composta de 45 pacientes com periodontite agressiva generalizada. Todos os pacientes tinham entre 15 e 40 anos, com média de idade de 28,8 anos. As médias dos dados clínicos de todos os pacientes estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Foi observada a presença de *P. gingivalis* em 29 pacientes(64,4%), de *A. actinomycetemcomitans* em 13 pacientes(28,8%) e do genótipo *fimA* II em 25 dos 29 pacientes positivos para *P. gingivalis*(86,2%). Não foi observada associação entre a presença de *P. gingivalis* e do seu genótipo *fimA* II à presença de *A. actinomycetemcomitans*.

Os dados completos referentes aos parâmetros clínicos periodontais e a presença dos microrganismos ou do genótipo *fimA* II estão apresentados na Tabela 3. Ao se comparar os dados clínicos entre os pacientes positivos e negativos para cada bactéria ou genótipo, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes que apresentaram *P. gingivalis* em sua microbiota e os que não apresentaram, sendo a média de idade superior nos pacientes positivos para essa bactéria.

Além disso, pacientes com *P. gingivalis* e pacientes com genótipo *fimA* II de *P. gingivalis* apresentaram maior perda de inserção periodontal nos sítios coletados para análise microbiana que pacientes que não apresentaram essa bactéria ou genótipo. Não foram observadas diferenças significantes para os demais dados clínicos.

Tabela 1- Dados clínicos dos participantes do estudo.

N	45
Média de idade (em anos)	28,8 ± 5,9
Variação de idade (em anos)	15-40
PS (média)	3,4 ± 0,7
NIC (média)	3,8 ± 0,9
PS (SC) (média)	9,0 ± 1,9
NIC (SC) (média)	9,9 ± 2,2
ISG (média %)	12,7 ± 9,8%
IP (média %)	32,1 ± 17,4%
Média de dentes	26 ± 2

PS - profundidade de sondagem NIC - nível clínico de inserção
ISG - índice de sangramento gengival³³ IP - índice de placa³³

PS (SC) – profundidade de sondagem do sítio coletado para análise microbiana
NIC (SC) – nível clínico de inserção do sítio coletado para análise microbiana

Tabela 3 - Características da amostra estudada de acordo com a presença ou ausência de bactéria/genótipo.

	Pg+	Pg-	Valor de p	fimA II+	fimA II-	Valor de p	Aa+	Aa-	Valor de p
N	29	16	-	25	4	-	13	32	-
Média de idade (anos)	30,1 ± 5,7	26,3 ± 5,5	0,03*	30,9 ± 5,0	25,5 ± 8,2	0,07	30,6 ± 8,2	28,1 ± 6,5	0,21
PS (mm)	3,4 ± 0,5	3,3 ± 0,9	0,67	3,4 ± 0,5	3,5 ± 0,6	0,46	3,6 ± 0,8	3,2 ± 0,6	0,60
NIC (mm)	3,9 ± 0,8	3,7 ± 1,1	0,55	3,9 ± 0,8	3,7 ± 0,7	0,70	4,0 ± 1,0	3,7 ± 0,8	0,44
PS (SC)	9,4 ± 1,8	8,2 ± 1,8	0,06	9,6 ± 1,9	8,3 ± 1,3	0,06	9,6 ± 1,9	8,7 ± 1,9	0,28
NIC (SC)	10,5 ± 2,2	8,8 ± 1,9	0,01*	10,8 ± 2,1	8,5 ± 1,3	0,04*	10,2 ± 2,4	9,8 ± 2,2	0,60
IP (%)	37,3 ± 16,6	25 ± 16,5	0,05	38,2 ± 13,3	29,7 ± 9,7	0,50	25,0 ± 13,0	35,1 ± 18,3	0,14
ISG (%)	13,5 ± 11	11,3 ± 8,3	0,71	14,7 ± 11,3	7,3 ± 6,5	0,27	10,5 ± 6,9	13,5 ± 10,7	0,47

PS – Média de profundidade de sondagem

PS (SC) – Média da profundidade de sondagem do sítio coletado

Pg+ – Presença de *Porphyromonas gingivalis*

FimAII+ – Presença do genótipo fimA II de Pg

Aa+ – Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

IP – Índice de placa³³

* Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

NIC – Média do nível clínico de inserção

NIC (SC) – Média do nível clínico de inserção do sítio coletado

Pg- – Ausência de *Porphyromonas gingivalis*

FimAII- – Ausência do genótipo fimA II de Pg

Aa- – Ausência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

ISG – Índice de sangramento gengival³³

6 DISCUSSÃO

Periodontite agressiva tem sido relacionada a *A. actinomycetemcomitans*⁴, mas, em algumas populações e especialmente em pacientes com a forma generalizada da doença, *P. gingivalis* tem se mostrado um patógeno importante.^{5; 6} No presente estudo, foi encontrada uma maior prevalência de *P. gingivalis* (aproximadamente 65%) que de *A. actinomycetemcomitans* (aproximadamente 28%) nos pacientes com periodontite agressiva. Dentre os pacientes colonizados por *P. gingivalis*, o genótipo *fimA* II foi observado em mais de 85% das amostras. A identificação desses patógenos e genótipo foi escolhida devido a diversos estudos os relacionarem a progressão de doenças periodontais^{21; 22; 37} e a periodontite agressiva.^{4; 6; 13}

Apesar de ter sido observada maior prevalência de *P. gingivalis* (64,4%), a proporção de indivíduos colonizados por essa bactéria foi menor que a encontrada em outros estudos, tanto em brasileiros,^{15; 38} como em outras populações.^{6; 39; 40} No Brasil, Cortelli³⁸, Missailidis¹⁵ e Imbronito⁴¹ e seus colaboradores detectaram *P. gingivalis* em 80%, 86,7% e 73,3% dos pacientes com periodontite agressiva, respectivamente. No Chile, Gajardo e colaboradores³⁹ encontraram *P. gingivalis* em 88,8% dos indivíduos. No Japão, Miura e colaboradores¹³ em 79,8% dos pacientes com periodontite agressiva e Takeuchi e seu grupo⁴⁰ relataram a ocorrência de *P. gingivalis* em 82,5% dos pacientes com a forma generalizada da doença. Feng e colaboradores⁶ também observaram alta prevalência de *P. gingivalis*, encontrando essa bactéria em quase 100% dos chineses com periodontite agressiva estudados. A menor prevalência de *P. gingivalis* encontrada no presente estudo pode estar relacionada ao fato de ter sido avaliado apenas o sítio de maior profundidade de sondagem de cada paciente, enquanto os estudos supracitados analisaram múltiplos sítios. Por outro lado, ao avaliar amostras de múltiplos sítios por pacientes através de metodologia semelhante a utilizada por nós, Savitt e colaboradores observaram maior probabilidade de encontrar periodontopatógenos nos sítios com maior profundidade de sondagem.⁴²

Maior prevalência de *P. gingivalis* que de *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com periodontite agressiva também foi encontrada no Brasil por Imbronito e colaboradores,⁴¹ mas a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* foi maior que em nosso estudo (50% versus 28,8%). Resultados semelhantes foram encontrados em coreanos, entretanto, apesar de ter sido observada

maior prevalência de *P. gingivalis* (96,8%) nos pacientes com periodontite agressiva, a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* também foi alta (75%).⁴³ Já Cortelli e colaboradores³⁸ encontraram prevalência semelhantes das duas bactérias em brasileiros com periodontite agressiva, com alta prevalência de *A. actinomycetemcomitans* (72%), sendo bastante superior a encontrada em nosso estudo. No entanto, em tais estudos foram incluídos pacientes tanto com a forma generalizada quanto localizada da doença, enquanto no nosso foram selecionados apenas pacientes com periodontite agressiva generalizada.

Em estudo de Feng e colaboradores⁶, a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* mostrou-se significativamente mais elevada em chineses com periodontite agressiva localizada quando comparada a forma generalizada. Quando analisados apenas pacientes com a forma generalizada da doença, 30,4% foram positivos para *A. actinomycetemcomitans*, porcentagem semelhante a encontrada por nós. Outro estudo em japoneses, de Thiha *et al.*,⁴⁴ também encontrou maior prevalência desse patógeno associado a periodontite agressiva localizada. Resultados semelhantes foram encontrados no Brasil por Faveri e colaboradores.³⁷ Esses autores observaram uma maior prevalência de *A. actinomycetemcomitans* apenas em bolsas rasas e intermediárias de pacientes com periodontite agressiva localizada, enquanto alta prevalência de *P. gingivalis* foi observada em ambas as formas de doença, sugerindo que *A. actinomycetemcomitans* está relacionado à ocorrência de periodontite agressiva localizada, enquanto *P. gingivalis* está relacionada à progressão dessa doença e à periodontite agressiva generalizada em brasileiros.³⁷ Haraszthy e colaboradores³⁶ sugeriram, ainda, que ocorra uma mudança na virulência de *A. actinomycetemcomitans* com o tempo. Eles encontraram uma mudança na leucotoxicidade desse patógeno em pacientes com periodontite agressiva localizada (na época chamada periodontite juvenil), que mostravam-se colonizados por clones de alta leucotoxicidade e passaram a ser colonizado por clones de baixa leucotoxicidade com o passar do tempo.³⁶ Dessa forma, *P. gingivalis* parece apresentar um papel mais importante em indivíduos mais velhos e com a forma generalizada da doença, como observado no presente estudo.

Em relação ao genótipo *fimA*, até o presente momento não foram publicados dados da prevalência dos diferentes genótipos especificamente em brasileiros com periodontite agressiva. A prevalência do genótipo *fimA* II encontrada em nosso estudo foi bastante elevada (86,2%), mostrando-se superior aos estudos de Miura e colaboradores¹³ e Feng e colaboradores⁶, em que avaliaram a prevalência dos seis genótipos em pacientes com periodontite agressiva e ambos

encontraram o genótipo *fimA* II em maior proporção dos indivíduos estudados (Em 40,5% e 47,3%, respectivamente).

O genótipo *fimA* II tem sido comumente relacionado a destruição periodontal,^{8; 10; 14; 23; 30;}³¹ dessa forma sendo relacionado como o mais virulento. Nakagawa e colaboradores²³ demonstraram que o genótipo *fimA* II apresenta maior capacidade de aderir e invadir células epiteliais humanas que os demais genótipos. Adicionalmente, foi evidenciada maior indução de resposta inflamatória com a injeção de suspensão de bactérias com o genótipo *fimA* II quando comparada aos demais genótipos em um modelo de abscesso em ratos⁴⁵ e em cultura de células⁴⁶. Além disso, ao realizar a substituição do genótipo *fimA* I pelo II, Kato e colaboradores⁴⁷ observaram aumento da adesão e invasão epitelial, e os mutantes com o genótipo *fimA* II causaram maior reação inflamatória com indução de interleucinas pró-inflamatórias em modelo de abscesso em ratos.⁴⁷ Esses estudos sugerem, assim, que o genótipo *fimA* II é um importante fator relacionado à virulência de *P. gingivalis*. Entre as implicações clínicas, a avaliação da presença desse genótipo pode ser utilizada para a identificação de indivíduos de risco, para escolha de planos de tratamento e para avaliação do prognóstico da doença. A partir desse conhecimento, pode-se ainda sugerir novas estratégias de tratamento, como proposto por Hijiya e colaboradores, que desenvolveram um método de imunização passiva através de anticorpo monoclonal em ratos a partir de cepas de *P. gingivalis fimA* II, tendo encontrado inibição da produção de IL-8 em cultura de fibroblastos gengivais tratados com LPS⁴⁸.

Ao se relacionar a presença das bactérias e genótipo aos parâmetros periodontais, não encontramos diferenças para a média geral de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, índice de placa e índice de sangramento gengival encontrados nos pacientes. Entretanto, ao se relacionar apenas a perda de inserção do sítio em que foi colhida a amostra estudada, observamos perda de inserção estatisticamente maior nos sítios positivos para *P. gingivalis* quando comparado aos sítios negativos para essa bactéria, da mesma forma que a presença do genótipo *fimA* II foi associada a maiores valores de nível clínico de inserção no sítio coletado. Esse resultado corrobora com os encontrados por Hamlet,⁴⁹ Teixeira²⁹ e Yano-Higuchi⁵ e seus respectivos colaboradores, que relacionaram uma maior prevalência de *P. gingivalis* com o aumento da perda de inserção e com Amano e colaboradores²² e Zhao e colaboradores,¹⁴ que encontraram maior prevalência do genótipo *fimA* II em bolsas periodontais mais profundas. Em contrapartida, o mesmo estudo de Teixeira e colaboradores,²⁹ assim como Missailidis e

colaboradores,¹⁵ ambos realizados no Brasil, não observaram relação entre o aumento da profundidade de sondagem e a presença do genótipo *fimA* II.

A presença de *P. gingivalis* foi também relacionada à idade em nosso estudo. A média de idade dos pacientes com sítios colonizados por esse patógeno foi significativamente mais elevada que a média dos indivíduos em que *P. gingivalis* não foi encontrado. Resultado semelhante foi observado em australianos⁴⁹, em que *P. gingivalis* foi encontrada em maior proporção em indivíduos mais velhos, assim como em japoneses²², em que foi encontrada maior prevalência de *P. gingivalis* e do genótipo *fimA* II em mulheres mais velhas.

Além do genótipo *fimA* II, os genótipos IV e Ib têm sido relacionados a periodontite crônica^{8; 10; 14; 23; 30; 31} e o tipo Ib à periodontite agressiva,^{6; 13} mesmo que em menor proporção que o tipo II. Além disso, há a possibilidade de co-infecção por diferentes genótipos.²³ Assim, seria também importante avaliar os demais genótipos. Por outro lado, como a prevalência de *fimA* II foi bastante elevada, pode-se sugerir que novos estudos apontem para que este genótipo mais virulento possa desempenhar um papel importante na etiologia da periodontite agressiva generalizada.

7 CONCLUSÃO

Nesta amostra de indivíduos com periodontite agressiva generalizada, foi encontrada alta prevalência de *P. gingivalis* e de seu genótipo *fimA* II, assim como baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, não sendo observada correlação entre a presença de *P. gingivalis* e de seu genótipo *fimA* II com a presença de *A. actinomycetemcomitans*. Ainda observou-se que *P. gingivalis* parece ser mais comumente encontrada em indivíduos mais velhos com essa doença e em sítios com maior destruição periodontal.

REFERÊNCIAS

- ¹ ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, Dez 1999.
- ² Parameter on aggressive periodontitis. American Academy of Periodontology. **J Periodontol**, v. 71, n. 5 Suppl, p. 867-9, Maio 2000.
- ³ ALBANDAR, J. M.; BROWN, L. J.; LOE, H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. **J Periodontol**, v. 68, n. 10, p. 973-81, Out 1997.
- ⁴ TONETTI, M. S.; MOMBELLI, A. Early-onset periodontitis. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 39-53, Dez 1999.
- ⁵ YANO-HIGUCHI, K. et al. Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 8, p. 597-602, Ago 2000.
- ⁶ FENG, X. et al. Detection of Eight Periodontal Microorganisms and Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA Genotypes in Chinese Patients With Aggressive Periodontitis. **J Periodontol**, v. 85, n. 1, p. 150-9, Jan 2014.
- ⁷ SCHACHER, B. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. **J Clin Periodontol**, v. 34, n. 7, p. 566-73, Jul 2007.
- ⁸ AMANO, A. et al. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status. **J Dent Res**, v. 79, n. 9, p. 1664-8, Set 2000.
- ⁹ NAKAGAWA, I. et al. Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. **Infect Immun**, v. 70, n. 1, p. 277-85, Jan 2002.
- ¹⁰ VAN DER PLOEG, J. R. et al. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in dental plaque. **FEMS Microbiol Lett**, v. 232, n. 1, p. 31-7, Mar 12 2004.
- ¹¹ DA SILVA-BOGHOSSIAN, C. M. et al. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. **Arch Oral Biol**, Mar 2011.
- ¹² CASARIN, R. C. et al. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 45, n. 5, p. 635-42, Out 2010.

- ¹³ MIURA, M. et al. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in patients with aggressive periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 40, n. 2, p. 147-52, Abr 2005.
- ¹⁴ ZHAO, L. et al. Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in Chinese adults. **J Periodontal Res**, v. 42, n. 6, p. 511-7, Dez 2007.
- ¹⁵ MISSAILIDIS, C. G. et al. Distribution of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, n. 4, p. 224-9, Ago 2004.
- ¹⁶ HAMADA, S. et al. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. **Oral Microbiol Immunol**, v. 13, n. 3, p. 129-38, Jun 1998.
- ¹⁷ HIRAMINE, H. et al. *Porphyromonas gingivalis* 67-kDa fimbriae induced cytokine production and osteoclast differentiation utilizing TLR2. **FEMS Microbiol Lett**, v. 229, n. 1, p. 49-55, Dez 2003.
- ¹⁸ TAMURA, K. et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Japanese children and adolescents. **J Periodontol**, v. 76, n. 5, p. 674-9, Maio 2005.
- ¹⁹ BEIKLER, T. et al. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Caucasians. **Eur J Oral Sci**, v. 111, n. 5, p. 390-4, Out 2003.
- ²⁰ AMANO, A. et al. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. **J Periodontal Res**, v. 39, n. 2, p. 136-42, Abr 2004.
- ²¹ AKIYAMA, S. et al. Relationship of periodontal bacteria and *Porphyromonas gingivalis* fimA variations with phenytoin-induced gingival overgrowth. **Oral Dis**, v. 12, n. 1, p. 51-6, Jan 2006.
- ²² AMANO, A. et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 5, p. 1426-30, Maio 1999.
- ²³ NAKAGAWA, I. et al. Identification of a new variant of fimA gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 37, n. 6, p. 425-32, Dez 2002.
- ²⁴ NAKAGAWA, I. et al. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of fimA gene. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 5, p. 1909-14, Maio 2000.
- ²⁵ AMANO, A. et al. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. **J Periodontol**, v. 72, n. 3, p. 368-73, Mar 2001.
- ²⁶ ASANO, H. et al. Relationship between transmission of *Porphyromonas gingivalis* and fimA type in spouses. **J Periodontol**, v. 74, n. 9, p. 1355-60, Set 2003.

- ²⁷ FUJISE, O. et al. Involvement of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotype in treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. **J Periodontol**, v. 76, n. 10, p. 1661-6, Oct 2005.
- ²⁸ DAVILA-PEREZ, C. et al. Distribution of genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in type 2 diabetic patients with periodontitis in Mexico. **J Clin Periodontol**, v. 34, n. 1, p. 25-30, Jan 2007.
- ²⁹ TEIXEIRA, S. R. et al. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and fimA genotypes in smoker chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 6, p. 482-7, Jun 2009.
- ³⁰ HAYASHI, F. et al. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Japanese children. **J Oral Sci**, v. 54, n. 1, p. 77-83, Mar 2012.
- ³¹ PUIG-SILLA, M. et al. Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontal bacteria in a Spanish population with chronic periodontitis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n. 6, p. e1047-53, Nov 2012.
- ³² FABRIZI, S. et al. Variability of the fimA gene in *Porphyromonas gingivalis* isolated from periodontitis and non-periodontitis patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 18, n. 1, p. e100-5, Jan 2013.
- ³³ AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J**, v. 25, n. 4, p. 229-35, Dez 1975.
- ³⁴ TRAN, S. D.; RUDNEY, J. D. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 11, p. 2674-8, Nov 1996.
- ³⁵ ASHIMOTO, A. et al. 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. 266-73, Ago 1996.
- ³⁶ HARASZTHY, V. I. et al. 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. 912-22, Jun 2000.
- ³⁷ FAVERI, M. et al. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 9, p. 739-49, Set 2009.
- ³⁸ CORTELLI, J. R. et al. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 8, p. 860-6, Ago 2005.
- ³⁹ GAJARDO, M. et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. **J Periodontol**, v. 76, n. 2, p. 289-94, Feb 2005.

- ⁴⁰ TAKEUCHI, Y. et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. **J Periodontol**, v. 74, n. 10, p. 1460-9, Out 2003.
- ⁴¹ IMBRONITO, A. V. et al. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. **J Periodontol**, v. 79, n. 12, p. 2313-21, Dez 2008.
- ⁴² SAVITT, E. D. et al. Site selection criteria for microbiological testing of periodontal microorganisms. **J Periodontol**, v. 62, n. 9, p. 558-61, Set 1991.
- ⁴³ LEE, J. W. et al. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. **J Periodontol**, v. 74, n. 9, p. 1329-35, Set 2003.
- ⁴⁴ THIHA, K. et al. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. **Oral Microbiol Immunol**, v. 22, n. 3, p. 201-7, Jun 2007.
- ⁴⁵ NAKANO, K. et al. Comparison of inflammatory changes caused by Porphyromonas gingivalis with distinct fimA genotypes in a mouse abscess model. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, n. 3, p. 205-9, Jun 2004.
- ⁴⁶ GAO, L. et al. Identification of the putative specific pathogenic genes of Porphyromonas gingivalis with type II fimbriae. **DNA Cell Biol**, v. 31, n. 6, p. 1027-37, Jun 2012.
- ⁴⁷ KATO, T. et al. Virulence of Porphyromonas gingivalis is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 753-65, Mar 2007.
- ⁴⁸ HIJIYA, T. et al. A monoclonal antibody against fimA type II Porphyromonas gingivalis inhibits IL-8 production in human gingival fibroblasts. **Hybridoma (Larchmt)**, v. 29, n. 3, p. 201-4, Jun 2010.
- ⁴⁹ HAMLET, S. M. et al. Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia in an Australian population. **J Clin Periodontol**, v. 28, n. 12, p. 1163-71, Dez 2001.

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 intraclasse de profundidade de sondagem (PS) e de nível de inserção clínico (NIC) entre os dois exames.

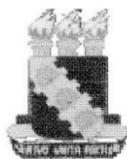
n	Dentes (média)	CCIC PS	CCIC NIC
6	20,8	0,80*	0,88*
6	20,5	0,86*	0,90*

**p < 0,0001*

CCIC- Coeficiente de correlação intraclasse

PS – Profundidade de sondagem

NIC – Nível de inserção clínico

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 *aggreatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* em pacientes portadores de periodontite agressiva e seus familiares”

Levamos ao conhecimento de V.S^a. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução 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)

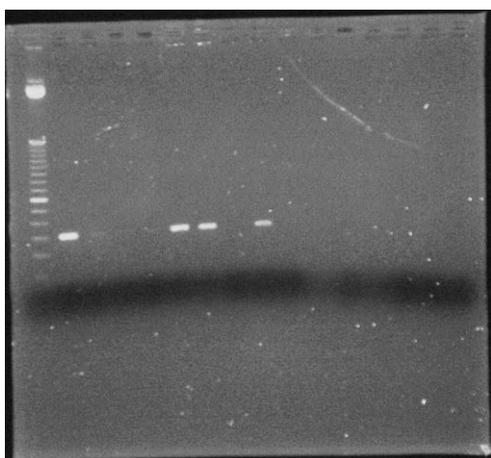
Consentimento do paciente
menor de 18 anos

Virgínia Régia Souza da Silveira
Pesquisador responsável

ANEXO C – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Eletroforese em géis de agarose para *Porphyromonas gingivalis*(Gel 1) e genótipo *fimA* II de *P. gingivalis*(Gel 2). Em cada gel, encontram-se: marcador de peso molecular no primeiro poço do gel; no segundo poço, amostra bacteriana sabidamente positiva para o microorganismo estudado; e no último poço, a água utilizada na reação, como controle negativo.

Gel 1



Gel 2

