

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Paulo Roberto Orzechowski

**EXISTE UMA ASSOCIAÇÃO ENTRE A COLONIZAÇÃO DE
PATÓGENOS PERIODONTAIS E A FREQUÊNCIA DE
SOROTIPOS ESPECÍFICOS DE *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS?**

Taubaté – SP
2012

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Paulo Roberto Orzechowski

**EXISTE UMA ASSOCIAÇÃO ENTRE A COLONIZAÇÃO DE
PATÓGENOS PERIODONTAIS E A FREQUÊNCIA DE
SOROTIPOS ESPECÍFICOS DE *AGGREGATIBACTER*
ACTINOMYCETEMCOMITANS?**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre pelo Programa de Pós-
graduação em Odontologia do Departamento
de Odontologia da Universidade de Taubaté.
Área de concentração: Periodontia
Orientador: Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino

Taubaté – SP
2012

PAULO ROBERTO ORZECOWSKI

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Universidade

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Universidade

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos meus queridos e amados pais, cujos corações se agigantam nos momentos de aflição;

À minha amada Alessandra, mulher que compartilha comigo o sentimento mais sublime: o amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino, pelos ensinamentos a mim passados;

Ao amigo Prof. Dr. Rogério de Lima Romeiro, incentivador incondicional na minha busca pelo sucesso;

Ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli, pelos conhecimentos magistralmente transmitidos;

À Prof. Dra. Sheila Cavalca Cortelli, pelas determinantes sugestões na execução do presente trabalho;

Ao amigo Prof. Jonas de Carvalho Filho, responsável pelas análises microbiológicas do presente trabalho;

Aos pacientes, que possibilitaram a coleta de dados necessária.

“Da vida sábia e sem perda
Melhor exemplo não topo
Que um livro na mão esquerda
E na mão direita um copo.

Com igual fervor constante
Tua mão colide e agrega
Bons livros, na tua estante
Bons vinhos, na tua adega”

Marta Cardoso

Vinhos e Livros

Orzechowski PR. Existe uma associação entre a colonização de patógenos periodontais e a frequência de sorotipos específicos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*? [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia; 2012, 56p.

RESUMO

Aggregatibacter actinomycetemcomitans é uma bactéria do tipo cocobacilo anaeróbia facultativa gram-negativa que coloniza a cavidade oral humana. Levando em consideração as associações bacterianas encontradas no biofilme dentário, estudos prévios têm sugerido que a ocorrência de sorotipos específicos de *A. actinomycetemcomitans* pode estar relacionada à ocorrência de outros micro-organismos orais. Curiosamente, as relações entre essas espécies de bactérias parecem sofrer influência de aspectos geográficos e étnicos. **Objetivo:** Este estudo tem como objetivo avaliar a frequência de sorotipo-específicos de *A. Actinomycetemcomitans* e suas associações com *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Campilobacter rectus* em indivíduos brasileiros. **Materiais e Métodos:** Um extenso grupo de indivíduos (n=1320) teve sua condição periodontal determinada e foram selecionados pela presença subgingival de algum sorotipo de *A. actinomycetemcomitans*. Sendo assim, um total de 263 indivíduos positivos para os sorotipos A, B, C e E foram considerados nessa pesquisa. Posteriormente, nesse mesmo grupo de indivíduos positivos, foram avaliadas, por PCR, a presença de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *C. rectus* nas bolsas periodontais. **Resultados:** Dos 263 indivíduos investigados, o sorotipo A de *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 28,5% dos casos, o sorotipo B em 15,97%, o sorotipo C em 51,71% e o sorotipo E em 3,80% dos indivíduos. A frequência do sorotipo A de *A. actinomycetemcomitans* foi significativamente maior em indivíduos positivos para *C. rectus* do que em indivíduos positivos para *P. gingivalis*, *P. intermedia* ou *T. forsythia*. Além disso, a frequência de sorotipos B e C foi significativamente maior tanto em indivíduos positivos para *C. rectus* quanto em *T. forsythia* quando comparados a indivíduos positivos para *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Entretanto, a frequência do sorotipo E não foi associada com a presença de nenhum dos periodontopatógenos investigados. **Conclusão:** Observamos uma associação positiva entre o sorotipo A de *A. actinomycetemcomitans* com *C. rectus* e entre o sorotipo B e C com *C. rectus* e *T. forsythia*.

Palavras-Chave: DNA bacteriano; Biofilmes; Microbiologia; *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Periodontite.

Orzechowski PR. Is there an association between periodontal pathogens colonization and the frequency of some specific serotype of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*? [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia; 2012, 56p.

ABSTRACT

Aggregatibacter actinomycetemcomitans is a gram-negative, facultative anaerobic coccobacillus bacterium that colonizes the human oral cavity. Regarding the bacterial consortium found into biofilms, previous studies have suggested that the occurrence of particular serotypes of *A. actinomycetemcomitans* may be related to other oral microorganisms. Interestingly, the relations among these bacterial species seem to be under influence of geographic and ethnical aspects. **Objective:** This study aimed to evaluate the frequency of *A. actinomycetemcomitans* serotype-specific antigens and its association with *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* and *Campilobacter rectus* in Brazilian subjects. **Method:** A wide group of subjects (n=1320) had their periodontal status determined and were screened for the subgingival presence of *A. actinomycetemcomitans* serotypes. Then, a total of 263 individuals *A. actinomycetemcomitans* positive for serotypes A, B, C and E were considered in this survey. Subsequently, in this same group of positive subjects, the presence of *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* and *C. rectus* from periodontal pockets were also evaluated by PCR. **Result:** Out of 263 subjects investigated, *A. actinomycetemcomitans* serotype A was detected in 28.5% subjects; serotype B in 15.97%; serotype C in 51.71% and serotype E in 3.80% subjects. The frequency of serotype A of *A. actinomycetemcomitans* was significantly higher in *C. rectus* positive subjects than in *P. gingivalis*, *P. intermedia* or *T. forsythia* positive subjects. Additionally, the frequency of serotypes B and C were significantly higher in both *C. rectus* and *T. forsythia* positive subjects in comparison to *P. gingivalis* and *P. intermedia* positive subjects. Meanwhile, the frequency of serotype E was not associated with the presence of the other periodontal pathogens investigated. **Conclusion:** We observed a positive association between *A. actinomycetemcomitans* serotypes A with *C. rectus* and between B and C serotypes with *C. rectus* and *T. forsythia*.

Keywords: Bacterial DNA; Biofilms; Microbiology; *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 DOENÇA PERIODONTAL	11
2.2 <i>AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS</i>	13
2.3 SOROTIPOS	17
2.4 <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>T. forsythia</i> e <i>C. rectus</i>	21
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MÉTODO	24
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	24
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	24
4.3 EXAME CLÍNICO PERIODONTAL	25
4.4 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	26
4.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	27
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5 RESULTADOS	29
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma das mais frequentes patologias infecciosas que atingem o ser humano. Afeta os tecidos de suporte e sustentação dos dentes. Apesar de sua origem multifatorial, essa patologia é dependente de colonização bacteriana específica (periodontopatógenos), que ocorre na forma de biofilme dentário (American Academy of Periodontology, 2001).

Algumas espécies bacterianas se destacam pela sua relação com a doença periodontal, entre elas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Campilobacter rectus*, *Eikenella corrodens* e *Treponema denticola*. Nem todas estão presentes em todos os casos de periodontite, porém, sua prevalência nessa condição é normalmente elevada (Socransky et al., 2002).

Um importante periodontopatógeno, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, divide-se pela sua toxicidade (máxima e mínima) e seus sorotipos (A, B, C, D, E, F e G). Esses diferentes sorotipos manifestam-se com maior intensidade geralmente em conformidade com a situação clínica, como o sorotipo A em casos de saúde periodontal, o tipo B em casos de periodontite agressiva e o tipo C em casos de periodontite crônica. A presença dos diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* parece sofrer influência direta de algumas bactérias comumente encontradas no sulco periodontal (Socransky & Haffajee, 1992).

A ocorrência concomitante de diferentes patógenos periodontais já foi amplamente demonstrada por vários estudos (Papapanou et al., 1997; Nonnenmacher et al., 2001; Takeuchi et al., 2001; Ximenez-Fyvie et al., 2006;

Joshi & Vandana, 2007; Feng et al., 2009) e, além disso, este parece ser um evento relativamente comum (Socransky et al., 1988). Todavia, estudos publicados no início da década de 90 sinalizaram que, em particular, a ocorrência simultânea de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* seria um evento pouco frequente (Ali et al., 1992; Riggio et al., 1996). Porém, há diferenças entre populações e na distribuição geográfica, sendo que a frequência de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo C pode ser maior em indivíduos *P. gingivalis* positivos quando comparados aos indivíduos *P. gingivalis* negativos, assim como *A. actinomycetemcomitans* sorotipo E foi detectado mais frequentemente em indivíduos *P. gingivalis* negativos em estudo incluindo uma amostragem de população asiática (Yoshida et al., 2003).

Logo, justifica-se a realização deste estudo para verificar se realmente existe relação entre as espécies *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *C. rectus*, modulando a expressão dos sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal é uma patologia que acomete os tecidos de suporte dos dentes, caracterizando-se por inflamação gengival, perda de inserção conjuntiva, reabsorção óssea alveolar e formação de bolsa periodontal, além de ser dependente da participação de bactérias periodontopatogênicas (AAP, 1999). Dentre os principais patógenos periodontais, podemos destacar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. intermedia* e *T. denticola*, (Socransky et al., 1998). Além desses, há outros microorganismos que fazem parte da microbiota bucal e não são detectados pelos exames atualmente disponíveis, caracterizando um grupo de bactérias “ainda não cultivadas”, já que ainda não há métodos para promover seu crescimento em laboratório (Colombo et al., 2009). Os microorganismos podem fazer parte do agrupamento de bactérias que provocam a doença periodontal e essa terá maior ou menor grau de agressividade conforme a interação entre elas, pois desenvolvem uma relação de competição ou mutualismo entre si, facilitando ou dificultando suas proliferações (López et al., 2011). As formas agressivas e crônicas da periodontite não são causadas por apenas um tipo de bactéria. São encontradas com frequência bactérias potencialmente periodontopatogênicas, tais como: *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* e *E. corrodens* em indivíduos com saúde periodontal e que não desenvolvem tal doença comprovando que tais microorganismos podem fazer parte da flora microbiana

normal do indivíduo (Armitage, 2010). Tais bactérias exercem e sofrem influência umas em relação às outras. A influência de bactérias sobre a colonização de *A. actinomycetemcomitans* foi demonstrada em estudo envolvendo diferentes microorganismos, no qual os pesquisadores analisaram diferentes bactérias juntas e isoladamente e compararam os resultados. Perceberam que *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sanguinis* interferiram no crescimento, na aderência às células epiteliais e na multiplicação de *A. actinomycetemcomitans* impedindo seu desenvolvimento, demonstrando assim que essa bactéria pode sofrer uma influência significativa de outros patógenos no ambiente bucal (Teughels et al., 2007). Essas interações entre si e sobre o organismo ocorrem pela ação de fatores de virulência liberados pelas bactérias, tais como a inibição da quimiotaxia de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), a morte de monócitos e PMNs, a liberação de proteases capazes de clivar a imunoglobulina G (IgG) e a produção de proteínas de ligação. Além disso, algumas bactérias como a *A. actinomycetemcomitans* possuem componentes de superfície capazes de promover a destruição óssea (Wilson & Henderson, 1995). A interação de fatores de virulência de alguns desses periodontopatógenos (como polissacarídeos de membrana e cápsulas bacterianas que reduzem a capacidade de resposta gengival através dos seus fibroblastos), é que irá desencadear um processo inflamatório mais exacerbado nos tecidos periodontais, levando a maior gravidade do caso (Brunner et al., 2010). Assim, as doenças periodontais podem ser divididas em alguns tipos, tais como a periodontite crônica (localizada ou generalizada) e a periodontite agressiva (localizada ou generalizada) (Armitage, 1999). O tipo de doença periodontal também é um fator de definição quanto a prevalência bacteriana. Na periodontite crônica são encontradas as bactérias: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*,

Capnocytophaga sputigena, *E. corrodens*, *Prevotella disiens*, *Peptostreptococcus micros*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella corporis*, *Peptostreptococcus magnus* e *Fusobacterium nucleatum* (Salari & Kadkhoda, 2004). Em casos de periodontite agressiva, são comumente encontradas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium sp.*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema sp.* (Lee et al., 2003). Nos casos de periodontite agressiva, há uma tendência de aumento na quantidade de citocinas presentes no meio crevicular. Assim, foi demonstrado que a presença de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em casos de periodontite agressiva, ao contrário de casos de periodontite crônica, leva a um aumento na quantidade de citocinas e a uma diminuição da quantidade de Imunoglobulina G e interleucina-10 no fluido gengival, aumentando assim a inflamação e a perda óssea ao redor dos dentes (Casarin et al., 2010). Tais mudanças podem ajudar a elucidar a progressão da doença periodontal.

2.2 AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS

A. actinomycetemcomitans foi primeiramente descrito pelo microbiologista alemão Klinger em uma amostra de actinomicose cervicofacial, sendo denominado *Bacterium actinomycetum comitans*. Após algumas propostas de alteração na nomenclatura, foi denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Tal nomenclatura foi modificada em 2006 para o atual *Aggregatibacter*

actinomycescomitans (Norskov-Lauritsen & Kilian, 2006). Trata-se de uma bactéria anaeróbia facultativa que está associada com a periodontite em diferentes graus, conforme demonstrado em estudo no qual os autores utilizaram 221 amostras de placa subgengival de uma população de 171 taiwaneses acometidos por periodontite (setenta dos quais apresentavam periodontite agressiva e 101 periodontite crônica) e cinquenta indivíduos saudáveis. Utilizando ensaio de imunofluorescência indireta, os autores encontraram uma prevalência de 84,3% de *A. actinomycescomitans* nos indivíduos com periodontite agressiva (com participação maior do sorotipo B), 60,4% nos indivíduos com periodontite crônica e 64% nos indivíduos saudáveis (com maior participação do sorotipo C), comprovando a heterogeneidade dessa bactéria na cavidade bucal (Yang et al., 2005). Está presente tanto na periodontite agressiva aguda como na periodontite crônica (Cortelli et al., 2005; Jentsch et al., 2012). Esse microorganismo pode expressar máxima ou mínima leucotoxicidade, fator que irá determinar maior ou menor capacidade de destruição tecidual (Cortelli et al., 2003; Roman-Torres et al., 2010). Tal característica está ligada à produção de uma leucotoxina (Ltx) derivada de uma proteína, que ajuda a bactéria a escapar da resposta imune do hospedeiro durante a infecção. Essa toxina atua na membrana celular que visa especificamente às células brancas do sangue (glóbulos brancos) (Kachlany, 2010). Casarin et al. (2010) demonstraram em estudo que a concentração de citocinas anti-inflamatórias e de imunoglobulina-G é menor nos casos de periodontite agressiva quando comparados a casos de periodontite crônica, ambas com infecção por *A. actinomycescomitans* e *P. gingivalis*. Também essa bactéria apresenta clones com variações genéticas que possuem grande potencial de destruição tecidual, tal qual o clone JP2, com incidência endêmica em adolescentes da África, segundo estudos de Kilian et al.

(2006), obtendo resultado semelhante ao de Haubek et al. (2007) e de Rylev & Kilian (2008). Esse mesmo clone foi encontrado em estudo com população brasileira por Cortelli et al. (2003), sendo encontrada em 31% das amostras coletadas em pacientes com periodontite agressiva, periodontite crônica e gengivite, sendo que a sua presença foi mais evidente em periodontite agressiva. Também foi encontrado em indivíduos caucasianos morando na Suécia e com raízes naquele país, como foi demonstrado por Claesson et al. (2011) em estudo no qual se demonstrou a presença do clone JP2 em duas pessoas da mesma família e que esses clones apresentavam as mesmas características dos clones JP2 da África. Porém, o mesmo clone não foi encontrado em estudo de Sakellari et al. (2011) em estudo com amostras de indivíduos com periodontite não tratada na Grécia. Essa colonização por grupos étnicos está mais relacionada a fatores dos hospedeiros (ou seja, da população) do que fatores geográficos, segundo Rylev & Kilian (2008). Já Van der Reijden et al. (2010) demonstraram outro tipo de clone pertencente ao gênero *A. actinomycetemcomitans* que é denominado E'. Tal qual sua designação indica, é um clone do sorotipo E, porém, diferente do clone JP2, aquele se espalha globalmente. O aparecimento desses clones com variações genéticas se dá por mutações no DNA da bactéria, que apresenta uma possibilidade de mudança em um terço do total de genes presentes no pangenoma que caracteriza todas as cepas desse micro-organismo, conforme descrito por Kittichotirat et al. (2011). *A. actinomycetemcomitans* apresenta clones com variações genéticas de grande potencial de destruição tecidual, como o clone JP2, com incidência endêmica em adolescentes da África (Kilian et al., 2006; Rylev & Kilian, 2008). Esse clone também pode ser encontrado em outras populações, como em indivíduos brasileiros (Cortelli et al., 2003) e em indivíduos caucasianos (Claesson et al., 2011), estando

relacionado sempre a condições de periodontite agressiva. Essa colonização por grupos étnicos está mais relacionada a fatores dos hospedeiros do que a fatores geográficos (Rylev & Kilian, 2008).

Outra característica de *A. actinomycetemcomitans* é sua capacidade de coabitar com diferentes grupos de bactérias, como dos complexos vermelho e laranja (Socransky et al., 1998). O complexo vermelho é formado pelas bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* e é correlacionado com situações de “clímax de colonização” em sítios com progressão de um quadro de periodontite (Holt & Ebersole, 2005). Já o complexo laranja é composto pelas bactérias *Prevotella intermedia* e *Campilobacter spp*, que são uma segunda linhagem bacteriana na doença periodontal, muito presentes em recidivas de periodontite (Li et al., 2004). Em outras situações de pesquisa, *A. actinomycetemcomitans* não apresentou correlação com outras bactérias dos complexos “vermelho” e/ou “laranja” e não apresentou prevalência com doença periodontal (López et al., 2011) comprovando a heterogeneidade desse microorganismo e sua diferente prevalência em diferentes populações. Trata-se de uma bactéria pouco resistente a variações, mesmo que pequenas, do pH (Bhattacharjee et al., 2011). *A. actinomycetemcomitans* pode ser detectada por diferentes exames diagnósticos, sendo o PCR real-time um método completo, já que demonstra a bactéria de maneira qualitativa e quantitativa. Em estudo de meta-análise sobre a diferença entre PCR real-time e cultura na detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, após serem analisados cinco estudos no período entre 2000 e 2007, afirmou-se que o PCR real-time apresenta muitas vantagens como exame diagnóstico bacteriano, já que o mesmo é rápido, sensível e

de grande exatidão, demonstrando a qualidade (tipo) do microorganismo e o número de bactérias presentes na amostra (Atieh, 2008).

Além das bolsas periodontais e do ambiente intrabucal, *A. actinomycetemcomitans* também pode ser encontrada no ambiente extraoral, em lesões cutâneas e na articulação temporomandibular, quando esta apresenta algum tipo de quadro infeccioso bacteriano (Kim et al., 2003). Porém, nos últimos trinta anos, menos de duzentos casos foram relatados na literatura internacional (Paju et al., 2000). Essa bactéria também é correlacionada em alguns estudos com infarto do miocárdio, embora não tenha sido possível estabelecer tal ideia, já que a reação imunológica sistêmica contra leucotoxinas pôde ser relacionada tanto a periodontite quanto ao infarto do miocárdio somente quando atuando na presença de *P. gingivalis* e não na presença de *A. actinomycetemcomitans*, conforme Brage et al. (2011) e Johansson et al. (2011). Em estudo de meta-análise, (Paturel et al., 2004) caracterizaram *A. actinomycetemcomitans* como um microorganismo capaz de provocar alterações marcantes no seu hospedeiro, como resultado do mecanismo de ação das suas toxinas e pela sua capacidade de aderir e penetrar nas células desse mesmo hospedeiro, facilitando assim sua disseminação. Os autores também relatam que novos sorotipos devem ser descobertos futuramente, dificultando assim o tratamento do paciente portador de tal bactéria, já que a mesma é muito versátil e heterogênea (Henderson et al., 2010).

2.3 SOROTIPOS

Existem sete sorotipos distintos de *A. actinomycetemcomitans* e cada um deles representa uma linhagem clonal diferente, sendo A, B, C, D, E, F e G. Dependendo do estágio da doença e do grupo populacional estudado, será detectada a presença maior de determinado sorotipo, geralmente A, B, C e E (Rylev & Killian, 2008). Os sorotipos D e F apresentam uma prevalência significativamente menor (Chen et al., 2010). Os diferentes sorotipos correlacionam-se e seus genótipos são determinantes quanto a sua toxicidade e consequente participação nos diferentes tipos de condição periodontal. A capacidade de formação de um biofilme denso auxilia *A. actinomycetemcomitans* na colonização e na agregação com outros microorganismos, fator esse dependente de suas adesinas e fímbrias, características essas definidas pelo seu genótipo (Fujise et al., 2008). Entre os sorotipos, também podem ser encontrados subtipos, como o subtipo E', que possui fenótipo muito semelhante ao sorotipo E e constitui uma linhagem estável dentro da classificação dos sorotipos, embora não apresente a mesma capacidade de metabolismo do sorotipo E original (Van der Reijden et al., 2010).

Os sorotipos B e C possuem características que os aproximam do ponto de vista microbiológico e são muito diferentes do sorotipo A. Aqueles são agressivos e encontrados em condições de periodontite agressiva (com maior prevalência do tipo B). O sorotipo B apresenta grande capacidade de agregação a *Fusobacterium nucleatum* mediado por seu polissacarídeo de membrana, O-PS (Rupani et al., 2008). Porém, também há estudos indicando que o sorotipo B não apresenta ação de perda óssea maior do que em casos de periodontite provocadas por bactérias com sorotipo "não-B" (Van der Reijden et al., 2008). Em estudo com abordagem nas diferenças genômicas entre as cepas de *A. actinomycetemcomitans*, foram examinados os diferentes arranjos no genoma nos sorotipos A, B e C. Os resultados

mostraram evidentes divergências na disposição genômica do sorotipo A quando comparado aos outros dois sorotipos. Tais diferenças indicam uma evolução histórica diferente entre tais cepas e que há efetivamente diferenças fenotípicas entre elas (Kittichotirat et al., 2010). A diferença na prevalência de cepas de alta e baixa leucotoxicidade entre os sorotipos reforça a hipótese de que o tipo A está relacionado com menor agressividade devido a sua menor virulência, diferentemente dos tipos B e C e, conseqüentemente, com quadros de saúde periodontal (Kawamoto et al., 2009). Na população brasileira, estudos prévios demonstram um padrão de prevalência de sorotipo A relacionado à saúde periodontal, sorotipo B a periodontite agressiva, porém não exclusivamente; o sorotipo C relacionado a periodontite crônica e também a agressiva e o sorotipo E com uma incidência muito baixa nas inerentes condições periodontais. Os sorotipos D e F não foram diagnosticados (Cortelli et al., 2012). Os marcadores genômicos para as diferentes cepas de *A. actinomycetemcomitans* não parecem ser decisivas para a definição do seu potencial de desenvolvimento de doença periodontal, sendo que todos os sorotipos aparentemente apresentam potencial para participar de tal condição (Pinheiro et al., 2011). Claro está que os sorotipos apresentam uma distribuição totalmente diferente no seu genótipo, caracterizando cada sorotipo de maneira absolutamente diversa e com um potencial de agressividade próprio. Apesar disso, existe um “pangenoma” entre os diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, sendo que, aproximadamente dois terços dos genes se mantêm imutáveis e um terço deles são flexíveis, podendo mudar sua conformação, dando origem a novas cepas (Kittichotirat et al., 2011). Em estudo realizado no Brasil, 486 indivíduos foram analisados quanto a presença de *A. actinomycetemcomitans* na cavidade bucal. Foram avaliados índice de placa, profundidade de bolsas periodontais, índice de

sangramento e nível de inserção clínica. Foram recolhidas amostras subgingivais dos sítios com maior profundidade de sondagem de cada paciente e analisado pela técnica de PCR. Verificou-se que o sorotipo C está mais presente em casos de periodontite crônica, resultados estes semelhantes aos obtidos na Europa e Ásia (Roman-Torres et al., 2010). Em indivíduos asiáticos há uma alta prevalência de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos C e D, enquanto em europeus os sorotipos A, B e C são mais prevalentes (Kim et al., 2009). Foi realizado estudo em que os autores avaliaram a presença de periodontopatógenos em 32 indivíduos com periodontite crônica generalizada, 16 com periodontite agressiva generalizada e oito indivíduos com periodontite agressiva localizada. Os mesmos verificaram prevalência de 63% de *A. actinomycetemcomitans* para os indivíduos com periodontite agressiva localizada, 16% para os casos de periodontite crônica e 38% para os casos de periodontite agressiva generalizada. O estudo foi realizado em uma população japonesa e houve uma alta prevalência do sorotipo C nos casos crônicos (Thiha et al., 2007). O sorotipo C apresenta grande capacidade de agregação com *P. gingivalis*, bactéria reconhecidamente envolvida no processo de doença periodontal (Suzuki et al., 2006).

Em estudo de acompanhamento longitudinal de 38 pacientes portadores de *A. actinomycetemcomitans* separados por grupo, raça e idade durante um ano, verificou-se que 80% dos pacientes hospedeiros de *A. actinomycetemcomitans* desenvolveram periodontite, contra apenas 10% dos não portadores. Esses resultados demonstram haver uma associação positiva entre periodontite e *A. actinomycetemcomitans*, principalmente dos sorotipos A, B e C, que foram os de maior prevalência nesses casos (Fine et al., 2007). Recentemente, foi descoberto um novo sorotipo de *A. actinomycetemcomitans* (G). Este apresenta uma estrutura

de DNA semelhante aos sorotipos D e F. Suas propriedades de agregação e formação de biofilme são as mais fortes entre todos os sorotipos, mediadas por longas fibrilas presentes nas superfícies das células, embora sua toxicidade seja baixa se comparada aos sorotipos de A a C (Takada et al., 2010).

Vários são os métodos de detecção de *A. actinomycetemcomitans* e entre os mais conhecidos estão o PCR convencional e o PCR *real time* (qPCR). Ambos demonstram a presença do microorganismo, porém, o qPCR quantifica o microorganismo. Por ser um exame de resultado imediato, serve como excelente opção para exame fora do laboratório, em estudos de campo, como realizado em crianças da área rural do Haiti. Os autores encontraram uma prevalência alta de *A. actinomycetemcomitans* na maioria das crianças (67% a 81%) e concluíram que o PCR *real time* foi o método mais eficiente para a detecção dessa bactéria nesse tipo de estudo (Psoter et al., 2011).

2.4 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *C. rectus*

P. gingivalis apresenta longas fímbrias que colaboram muito no processo de iniciação e progressão da periodontite. É um microorganismo que sofre constantes mudanças no seu código genético com reflexos no seu fenótipo e no seu potencial de agressividade (Kuboniwa et al., 2010). Sofre influência e influencia diretamente *A. actinomycetemcomitans* nos seus diferentes sorotipos quando presentes no mesmo nicho (Yoshida et al., 2003). A bactéria *P. intermedia* faz parte do complexo laranja

de bactérias periodontais. A mesma é presença constante no periodonto e em condições de periodontite. É encontrada com frequência nos mesmos nichos de *A. actinomycetemcomitans*, porém não aumentam a destruição tecidual nessa condição, apenas interferindo no periodonto promovendo um maior grau de inflamação (Raslan et al., 2011).

T. forsythia é uma bactéria cuja presença é um indicador de lesão ativa e de um aumento no risco de perda de inserção do dente. É um microorganismo muito presente em casos de recolonização pós-tratamento de periodontite. Apresenta evidente interação com *A. actinomycetemcomitans* (Ready et al., 2008).

Já *C. rectus* é achado frequente tanto em quadros de saúde periodontal quanto de periodontite. Apresenta correlação direta com bactérias diversas, entre essas com *A. actinomycetemcomitans*. É um microorganismo que exerce uma importante função no início e na progressão da periodontite quando em presença das bactérias do complexo vermelho (Ito et al., 2010).

Todas essas bactérias apresentam-se com alta frequência em quadros periodontais diversos e sua interação ainda é uma incógnita que exige novos estudos para definir qual a sua influência sobre a doença periodontal (Ito et al., 2010).

3 PROPOSIÇÃO

A proposição do presente estudo foi avaliar a frequência de *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *C. rectus* em indivíduos *A. actinomycetemcomitans* sorotipo-específico positivos.

4 MÉTODO

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNITAU (CEP n° 390/07).

Foram incluídas no presente estudo amostras microbiológicas de 263 indivíduos positivos para *A. actinomycetemcomitans*, sendo 165 do sexo feminino e 98 do sexo masculino. Essas amostras encontravam-se estocadas a -80°C no laboratório de biologia molecular da Universidade de Taubaté.

Tais amostras foram identificadas como positivas por PCR e provenientes de amostras de fluido de sulco gengival de 1320 indivíduos que se apresentaram para tratamento na Clínica de Periodontia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté - UNITAU.

No momento da coleta das amostras, todos os indivíduos foram esclarecidos sobre todos os aspectos da pesquisa através de uma carta de informação e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram excluídos do presente estudo indivíduos submetidos a antibioticoterapia e tratamento periodontal nos últimos seis meses que antecederam a coleta, bem como diabéticos descompensados, imunossuprimidos, gestantes e lactantes.

Foram selecionados para o presente estudo indivíduos adultos (idade mínima de 19 anos), de ambos os gêneros, que apresentaram ao menos vinte dentes naturais na cavidade bucal.

4.3 EXAME CLÍNICO PERIODONTAL

Para a realização do exame clínico, foram utilizados: espelho plano nº 5 (Duflex), pinça para algodão (Duflex) e sonda periodontal milimetrada tipo Williams (Hu-Friedy) esterilizados.

O exame clínico periodontal completo foi realizado em seis pontos por dente, observando os valores de Profundidade de Sondagem (PS), Nível Clínico de Inserção (NCI), Índice de Placa (IP) e Índice Gengival (IG) (Ainamo & Bay, 1975).

Para calibração do examinador, foi aplicado o método Erro Padrão da Medida (EPM) para as variáveis contínuas PS e NCI e o índice estatístico Kappa (K) para as variáveis categóricas IP e ISG (Araújo et al., 2003). O examinador foi considerado calibrado quando apresentou resultados de EPM e K entre 0.8 e 0.95.

4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador tipo Mastercycler Gradient (Eppendorf®) na seguinte condição: Um ciclo inicial a 95°C/5min., 35 ciclos 95°C/30seg., 55°C/30seg., 72°C/1min., e um ciclo final de 72°C/5min.

Com a finalidade de verificar o sucesso do processo de extração do DNA, todas as amostras envolvidas no presente estudo foram processadas inicialmente utilizando *primer* específico para o gene da actina humana. As amostras foram processadas com *primers* específicos para os sorotipos A, B, C, D, E e F e para os patógenos *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *C. rectus*. A figura 1 apresenta os *primers* que foram utilizados no presente estudo.

	Primer
<i>P. intermedia</i>	For TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG Rev TCAACATCTCTGTATCCTGCGT
<i>P. gingivalis</i>	For AGGCAGCTTGCCATACTGCGG Rev ACTGTTAGCAACTACCGATGT
<i>T. forsythia</i>	For GCGTATGTAACCTGCCCGCA Rev TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT
<i>C. rectus</i>	For TTTCGGAGCGTAAACTCCTTTTC Rev TTTCTGCAAGCAGACACTCTT

<i>A. actinomycescomitans</i> Sorotipo A	For GCAATGATGTATTGTCTTCTTTTGGGA Rev CTTGAGTTGAATGGGGATTGACTAAAAC
<i>A. actinomycescomitans</i> Sorotipo B	For CGGAAATGGAATGCTTGC Rev CTGAGGAAGCCTAGCAAT
<i>A. actinomycescomitans</i> Sorotipo C	For AATGACTGCTGTCCGAGT Rev CGCTGAAGGTAATGTCA
<i>A. actinomycescomitans</i> Sorotipo D	For TTACCAGGTGTCTAGTCGGA Rev GGCTCCTGACAACATTGGAT
<i>A. actinomycescomitans</i> Sorotipo E	For CGTAAGCAGAAGAATAGTAAACGT Rev AATAACGATGGCACATCAGACTTT
<i>A. actinomycescomitans</i> Sorotipo F	For ARAAYTTYTCWTCGGGAATG Rev CCTTTATCAATCCAGACAGC

Figura 1 – Descrição dos primers que foram utilizados no presente estudo

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para a análise dos produtos amplificados por PCR foi empregada eletroforese conduzida a 10V/cm² em solução tamponada (TBE) por uma hora, empregando-se gel de agarose a 1% corados com brometo de etídio. A visualização foi realizada em câmara de irradiação ultravioleta (UV). Um marcador de peso molecular (Ladder 100 – Invitrogen®), assim como controles positivos e negativos foram empregados em

todos os géis, que foram fotografados e comparados com os produtos amplificados a partir de cepas padrão, cedidas pelo Instituto Fio Cruz, RJ.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico foi realizado com o auxílio dos softwares *SPSS* 11.0 e *Bio Estat* 5.0. O nível de significância empregado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Para as diversas situações analíticas realizadas, os testes estatísticos Qui-quadrado e *t* de Student foram empregados.

5 RESULTADOS

Foram incluídos no presente estudo 263 indivíduos positivos para *A. actinomycetemcomitans*, sendo 98 do gênero masculino e 165 do gênero feminino ($28,31 \pm 6,32$ anos de idade).

Foi observada maior ($p < 0,05$) frequência de sorotipo C, seguido de A, B e finalmente sorotipo E. Os sorotipos D e F não foram identificados na população estudada (Figura 2).

C. rectus apresentou a maior frequência ($p < 0,05$), seguido de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia*, que apresentaram frequências estatisticamente equivalentes (Figura 3).

Os parâmetros clínicos periodontais PS e NCI mostraram-se estatisticamente ($p < 0,05$) com os maiores valores nos indivíduos portadores de sorotipo B em comparação aos demais sorotipos (Tabela 1).

Foi proposta uma avaliação da frequência dos patógenos periodontais isoladamente para os sorotipos A, B, C e E. Os indivíduos portadores de sorotipo A apresentaram maior frequência ($p < 0,05$) de *C. rectus* do que os demais patógenos, que se apresentaram estatisticamente semelhantes (Figura 4). Para os portadores de sorotipos B e C, *C. rectus* e *T. forsythia* mostraram-se mais frequentes ($P < 0,05$) do que *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Figuras 5 e 6). Para os indivíduos portadores do sorotipo E não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência dos patógenos periodontais (Figura 7).

Finalmente, foi proposta uma análise da frequência dos sorotipos em função da presença específica dos patógenos periodontais. Independente do patógeno avaliado, sempre o sorotipo C apresentou-se mais ($p < 0,05$) frequente, seguido de A, B e, finalmente, sorotipo E (Figura 8).

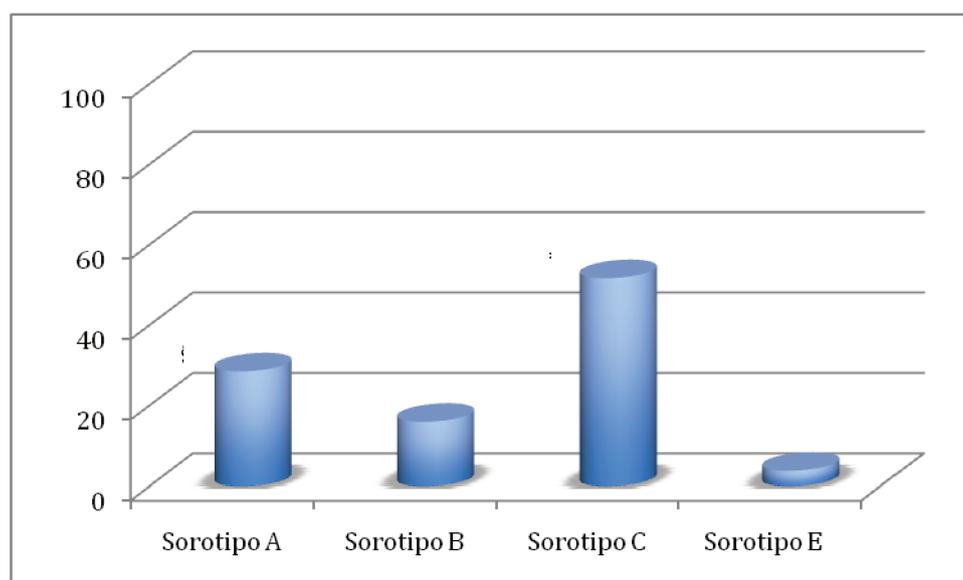


Figura 2 – Distribuição da frequência dos sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* na população estudada

*, §, # - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Teste Qui-quadrado

Tabela 01 – Distribuição dos valores médios de PS e NCI em função dos sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*

	Sorotipo A Média ± DP	Sorotipo B Média ± DP	Sorotipo C Média ± DP	Sorotipo E Média ± DP
PS	2,34 ± 0,21	3,94 [*] ± 0,34	2,29 ± 0,19	2,58 ± 0,22
NCI	2,03 ± 0,48	2,49 [*] ± 0,72	1,98 ± 0,19	2,01 ± 0,25

PS = profundidade de sondagem, NCI = nível clínico de inserção, DP – Desvio padrão,

* = Diferença estatisticamente significativa, Teste *t* de Student

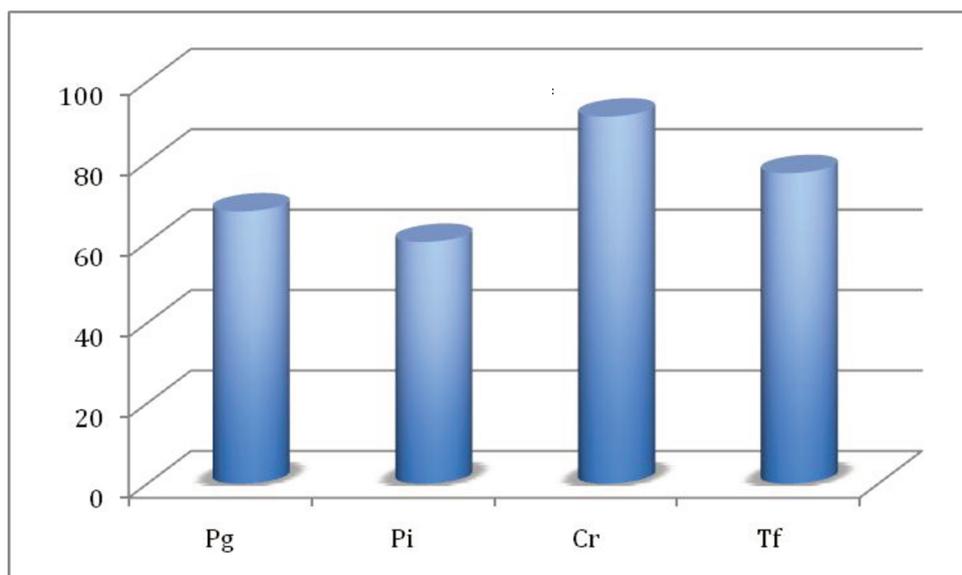


Figura 3 – Distribuição da frequência dos patógenos periodontais na população estudada

*- Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Teste Qui-quadrado

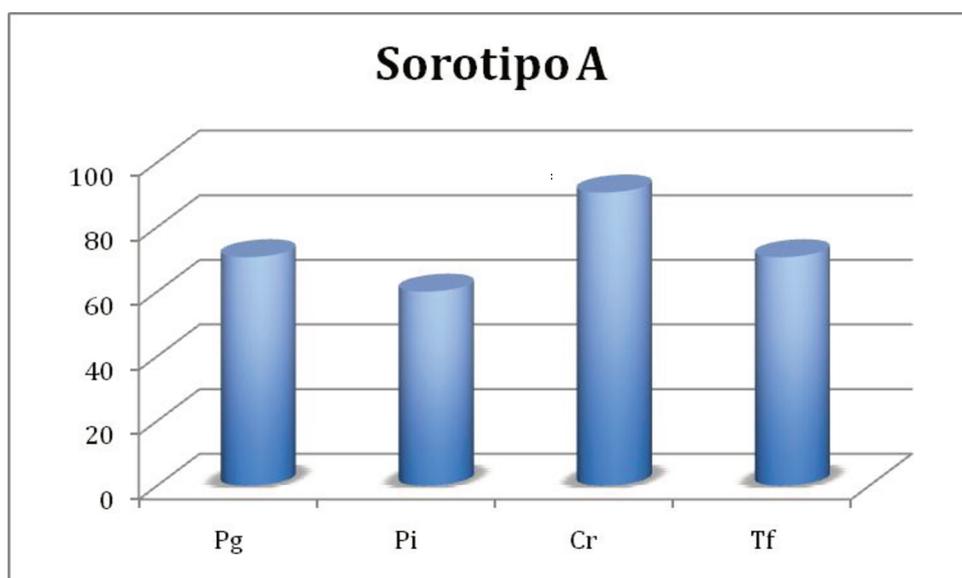


Figura 4 – Distribuição da frequência dos patógenos periodontais nos indivíduos portadores de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo A

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Teste Qui-quadrado

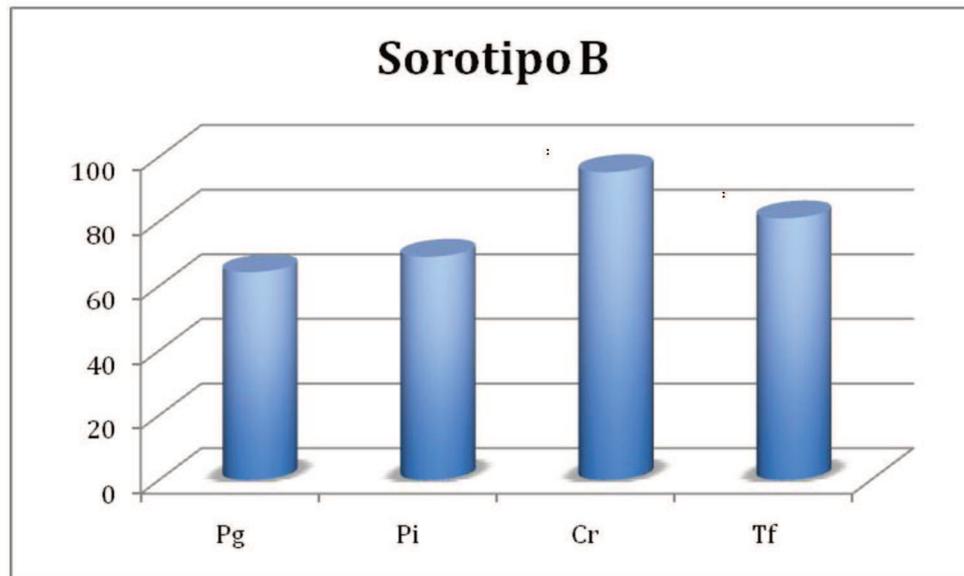


Figura 5 – Distribuição da frequência dos patógenos periodontais nos indivíduos portadores de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo B

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Teste Qui-quadrado

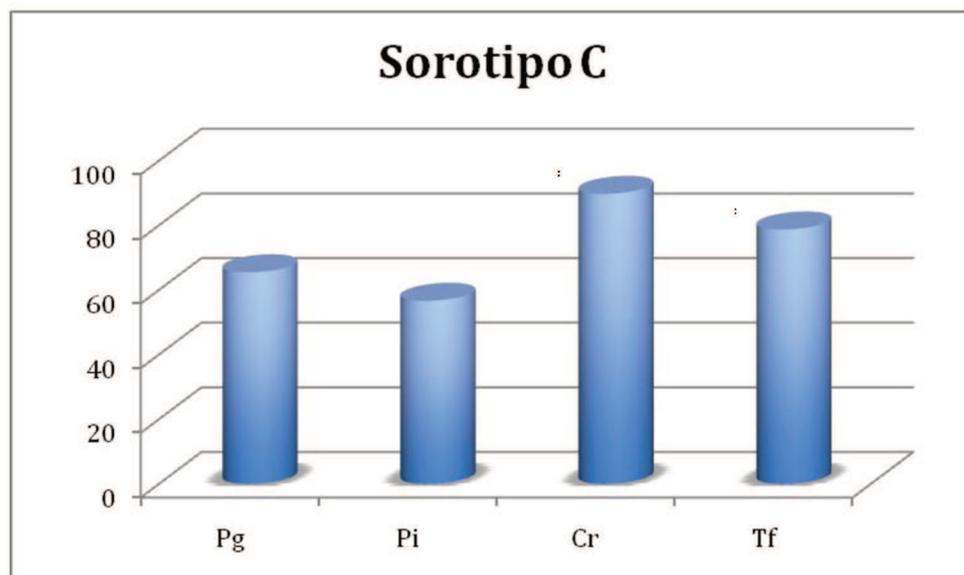


Figura 6 – Distribuição da frequência dos patógenos periodontais nos indivíduos portadores de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo C

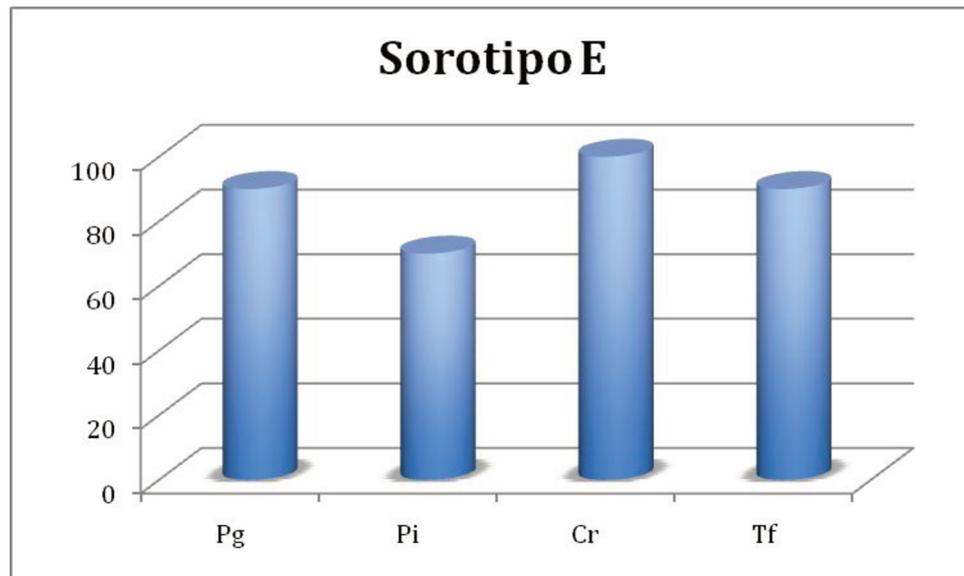


Figura 7 – Distribuição da frequência dos patógenos periodontais nos indivíduos portadores de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo E

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Teste Qui-quadrado

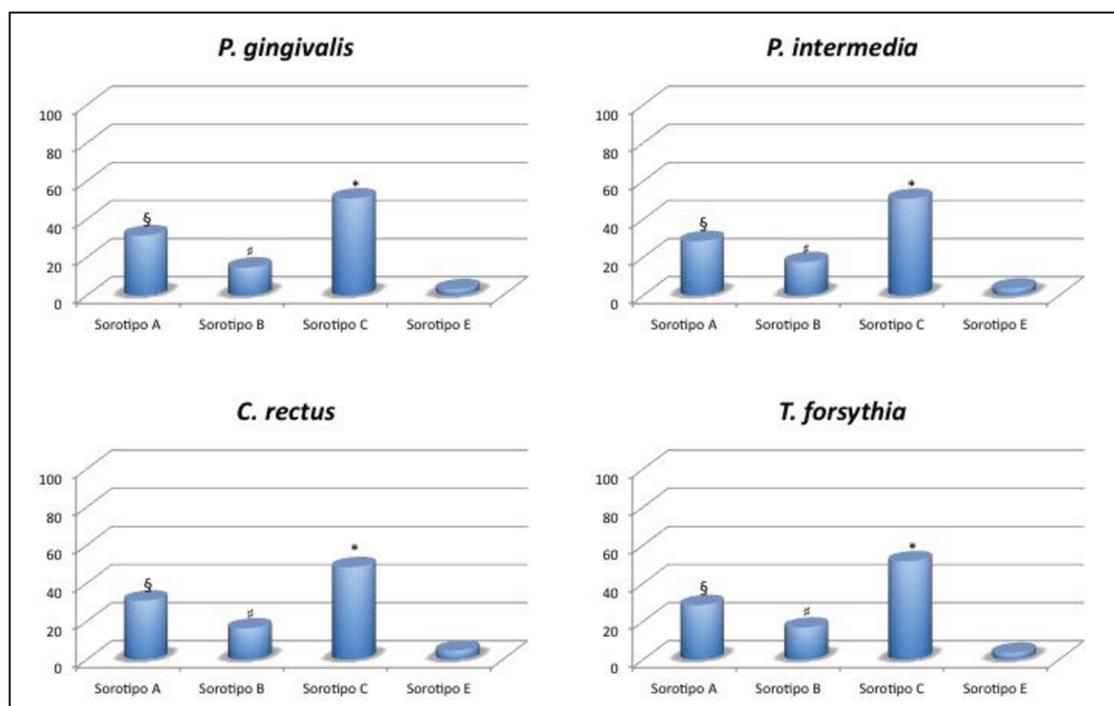


Figura 8 – Distribuição da frequência dos sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* em função da presença dos patógenos periodontais

*, §, # - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Teste Qui-quadrado

6 DISCUSSÃO

A doença periodontal apresenta-se como uma patologia de etiologia multifatorial, muito frequente no organismo humano, causada por bactérias (periodontopatógenos), com prevalência de um grande número de espécies, conforme Socransky et al. (1998), Haffajee (2009) e Dewhirst et al. (2010). As bactérias presentes na bolsa periodontal são predominantemente gram-negativas e anaeróbias, segundo estudo de Asikainen et al. (2010). Entre as bactérias, algumas se destacam por sua prevalência na periodontite, tais como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*, que foram efetivamente classificadas como agentes etiológicos da periodontite em um relatório de consenso da American Academy of Periodontology (1999). Não há consenso entre pesquisadores sobre qual a prevalência dos sorotipos entre as diferentes populações e se existe interferência na concentração dos sorotipos quando nos mesmos nichos de outras bactérias, sendo essa a proposta do estudo. Além das bactérias supracitadas, outras também apresentam correlação com quadros de periodontite, como *C. rectus*, *P. intermedia* e *E. corrodens*, segundo estudos de Meng et al. (2007), em conformidade com achados de López et al. (2011). No nosso estudo, estavam presentes em todas as coletas *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *C. rectus*, além de *A. actinomycetemcomitans*. *C. rectus* foi o microorganismo mais prevalente, presente em aproximadamente 90% das amostras coletadas, seguido de *T. forsythia*, *P. gingivalis* e, em menor concentração, *P. intermedia* (Figura 3). Além disso, *C. rectus* foi encontrado em cerca de 85% das amostras com o sorotipo A (Figura 4), sendo essa diferença

estatisticamente significativa, em aproximadamente 90% das amostras com sorotipo B (Figura 5), igualmente significativa estatisticamente, em cerca de 83% das amostras com o sorotipo C (Figura 6), diferença essa igualmente significativa estatisticamente e em aproximadamente 94% das amostras com sorotipo E (Figura 7). O sorotipo C foi encontrado com maior frequência quando considerada a presença de *C. rectus*, em aproximadamente 43% das amostras, seguido do sorotipo A, em cerca de 25%, do sorotipo B, em 17% e do sorotipo E, em número aproximado de 3% das amostras (Figura 8). A questão é qual a interação entre essas bactérias e os diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* em diferentes condições periodontais. No estudo de López et al. (2011), os autores afirmaram que todas essas bactérias caracterizam a doença periodontal como agressiva ou crônica, similarmente aos achados de Vieira et al. (2009), embora Ito et al. (2010) tenham descrito que há uma discrepância grande entre as espécies bacterianas presentes nas condições de agressividade ou de cronicidade da doença periodontal, sendo necessários novos estudos para definir tais microorganismos e suas interações em ambas as condições. A periodontite crônica foi descrita por Cortelli et al. (2010) como uma patologia com frequente participação de *A. actinomycetemcomitans*, sendo essa bactéria encontrada em aproximadamente 18% das amostras, em concordância com achados de Lafaurie et al. (2007) e Herrera et al. (2008), embora Yang et al. (2005) tenham relatado uma incidência de 60,4% dessa mesma bactéria nessa condição. No mesmo estudo de Herrera et al. (2008), os autores demonstram maior incidência desse mesmo microorganismo em pacientes jovens, corroborando estudos de Meng et al. (2009). Nos casos de periodontite agressiva, *A. actinomycetemcomitans* também participa como uma bactéria de definição dessa patologia, juntamente com *P. gingivalis*, baseado em

estudos de Slots & Ting (1999) e Kuboniwa et al. (2010). Apesar disso, López et al. (2011) afirmam que apenas a presença de *A. actinomycetemcomitans* no ambiente subgengival não define se haverá doença periodontal ou não. Além dessas características de colonização, *A. actinomycetemcomitans* também pode ser encontrada em quadros de saúde periodontal, conforme relatado por Joshi & Vandana (2007) e Jardim Júnior et al. (2006). No presente trabalho, tal bactéria encontrava-se presente em todas as amostras dos 263 indivíduos incluídos. No Brasil, é escasso o número de trabalhos envolvendo sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* em um número expressivo de amostras, como o de Jardim Júnior et al. (2006), que desenvolveram estudo com cem pacientes com periodontite crônica, 14 com doença periodontal agressiva, 142 crianças com gengivite em idade pré-escolar e 134 indivíduos adultos saudáveis.

No presente estudo, objetivamos verificar a interação entre diferentes bactérias (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *C. rectus*) e os sorotipos A, B, C e E de *A. actinomycetemcomitans*, já que há uma modulação quando presentes no mesmo nicho. Isto se dá pela produção de leucotoxinas, substâncias capazes de alterar a resposta inflamatória do organismo, conforme estudo de Wade (2011) e cuja opinião foi convergente com a de Theugels et al. (2007), cujo estudo in vitro demonstrou haver grande interação entre *A. actinomycetemcomitans* e outras bactérias frequentemente presentes no ambiente intraoral, tais como *S. sanguinis*, *S. mitis* e *S. salivarius*. Igualmente, Wu et al. (2007) demonstraram haver uma interação positiva entre *P. gingivalis* com positividade para genes de colagenase e fímbrias e *A. actinomycetemcomitans* com positividade para genes de leucotoxicidade. Esses microorganismos com essas características foram encontrados juntos em pacientes com doença periodontal crônica e não em

pacientes com saúde periodontal. Já Chen et al. (2010) demonstraram uma correlação negativa entre *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, situação semelhante aos resultados encontrados por Faveri et al. (2009). No presente estudo, *P. gingivalis* apresentou prevalência de aproximadamente 63% das amostras (Figura 3), sendo que sua presença foi na mesma proporção em amostras com sorotipo A (Figura 4), diminuindo para 60% em amostras com sorotipo B (Figura 5), mantendo essa concentração em amostras com sorotipo C (Figura 6) e elevando grandemente sua presença para aproximadamente 82% na presença de sorotipo E (Figura 7). Já a frequência do sorotipo C foi a maior, em cerca de 43% das amostras, quando em função da presença de *P. gingivalis*, seguido pelo sorotipo A, em aproximadamente 22%, sorotipo B, em 10% e finalmente sorotipo E, em aproximadamente 3% das amostras (Figura 8).

A liberação de fatores de inflamação, como a IL-1 β , será modulada pelas toxinas, conforme achados de Kelk et al. (2008), que demonstraram tal fenômeno in vitro. Esse tipo de interação é determinante na agressividade da doença periodontal. Casarin et al. (2010) também demonstraram a diminuição de IgG e IL-10 em casos de periodontite, demonstrando a interação entre fatores inflamatórios e defesa do organismo. Ready et al. (2008) observaram que a diminuição de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* contribuiu com o controle do quadro de periodontite dos indivíduos, que foram acompanhados em estudo longitudinal durante seis meses. Um dos fatores que modificam os microorganismos é a mutação do seu DNA, que dá origem a clones dos periodontopatógenos, como no caso de *P. gingivalis*. Isso dificulta a verificação da prevalência desses em eventuais coletas, conforme Kuboniwa et al. (2010). *T. forsythia* é um microorganismo comumente encontrado em coletas de pacientes com doença periodontal.

No presente estudo, foi encontrado em aproximadamente 72% das amostras (Figura 3), sendo que sua presença em amostras com sorotipo A foi de cerca de 64% (Figura 4), 77% em amostras com sorotipo B (Figura 5), o que foi uma diferença estatisticamente significativa, mesma prevalência em presença de sorotipo C (Figura 6), com igual significância estatística e presença em cerca de 82% das amostras com sorotipo E (Figura 7). O sorotipo C foi o de maior frequência em função da presença de *T. forsythia*, em aproximadamente 43% das amostras (Figura 8), o que foi estatisticamente significativo quando comparado com os outros sorotipos, sendo o sorotipo A em cerca de 22% das amostras, sorotipo C em cerca de 14% e o sorotipo E em aproximadamente 2% das amostras.

A. actinomycetemcomitans é dividida em diferentes sorotipos, cujo número atual é sete (A, B, C, D, E, F e G). Kanasi et al. (2010) apresentaram em estudo que, caso existam novos sorotipos, esses possuem uma amostragem muito baixa, ao menos para diagnóstico com os recursos presentes. Entre todos os sorotipos, o G foi o que teve a descoberta mais recente, protagonizada por Takada et al. (2010). Segundo Chen et al. (2010), os sorotipos A, B e C são os mais comumente encontrados na placa subgengival, em um total de 80% dos achados. Van der Reijden et al. (2008), em estudo longitudinal realizado com pacientes na Indonésia, com acompanhamento de oito anos, encontraram uma incidência de 30,2% para o sorotipo B. Ao longo dos oito anos, houve um decréscimo de pacientes positivos para o sorotipo B e um aumento para os sorotipos C e E. Ainda conforme Kawamoto et al. (2009), os sorotipos B e C aparentemente apresentam um maior potencial de agressividade do que o sorotipo A, resultado corroborado por Chen et al. (2010), em estudo sobre a incidência de sorotipos em indivíduos americanos com periodontite, no qual a maior amostragem nos resultados foi do sorotipo C, com 50% de amostras

positivas, seguido pelo sorotipo A, com 25,6%. Também Jentsch et al. (2012) afirmam que a incidência dos sorotipos A, B e C é maior em pacientes europeus classificados como portadores de periodontite. Esses resultados corroboram nossos achados, já que, no presente estudo, houve uma maior incidência de sorotipo C, seguido de A, B e, finalmente, o sorotipo E em menor prevalência (Figura 2). Os sorotipos D e F não foram encontrados, o que concorda com estudos de Cortelli et al. (2012), que demonstraram uma baixa incidência do sorotipo E e igualmente uma ausência dos sorotipos D e F em indivíduos brasileiros. Esse padrão de distribuição é irregular e varia conforme a posição geográfica e a etnia, já que Kim et al. (2009) encontraram uma alta incidência (19%) de sorotipo D em indivíduos coreanos, além da alta incidência de sorotipo E em estudo de Van der Reijden et al. (2008), no qual os mesmos encontraram uma incidência de 9,4% de pacientes positivos para o sorotipo E em estudo realizado com indivíduos da Indonésia.

O sorotipo A apresenta um sequenciamento genético totalmente diverso dos sorotipos B e C, demonstrando uma marcante diferença evolucionária entre tais sorotipos, segundo estudos de Kittichotirat et al. (2010, 2011). Cada um dos sorotipos está relacionado a diferentes condições periodontais, sendo que o sorotipo A é encontrado com frequência em quadros de saúde periodontal e periodontite crônica, conforme Roman-Torres et al. (2010) e Cortelli et al. (2012). No presente estudo, o sorotipo A foi encontrado com maior frequência acompanhado de *C. rectus* (Figura 4). O sorotipo B está relacionado à doença periodontal agressiva, conforme estudos de Yang et al. (2005), Haubek et al. (2007) e Ioannou et al. (2009), cujos resultados demonstraram uma incidência de 84,3% de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo B em quadros de periodontite agressiva. Em contrapartida, Van der Reijden et al. (2008) demonstraram que pacientes apresentando *A. actinomycetemcomitans*

sorotipo B não apresentaram maior perda de sustentação dos tecidos periodontais do que pacientes com outros sorotipos, divergindo dos nossos achados, já que encontramos uma diferença estatisticamente significativa nos parâmetros PS e NCI nos pacientes com maior incidência de sorotipo B (Tabela 1). Porém, corrobora o estudo de Sakellari et al. (2011), no qual os autores não conseguiram correlacionar o sorotipo B com quadros de periodontite agressiva em estudo na Grécia. No presente estudo, esse sorotipo foi encontrado em sítios com alta incidência de *C. rectus* e *T. forsythia*, bactérias que são facilmente encontradas em pacientes com periodontite agressiva, porém, não determinantes dessa condição. Além dessas bactérias, também *P. intermedia* é um achado comum em casos de pacientes com doença periodontal. No atual estudo, *P. intermedia* foi encontrada em aproximadamente 57% das amostras (Figura 3), sendo que sua prevalência em amostras com sorotipo A foi semelhante a esse valor (Figura 4). Em amostras com sorotipo B, sua presença foi em cerca de 62% (Figura 5), em amostras com sorotipo C, foi confirmada em cerca de 53% (Figura 6) e na presença do sorotipo E, esteve presente em aproximadamente 62% das amostras (Figura 7). O sorotipo C foi o mais frequentemente encontrado quando levada em consideração a presença de *P. intermedia*, diferença essa significativa quando levados em consideração os outros sorotipos. Foi seguido do sorotipo A, em cerca de 21% das amostras, que também representou uma diferença estatisticamente significativa, o sorotipo B em número próximo a 15% das amostras, também com significância estatística e finalmente o sorotipo E, em cerca de 3% das amostras (Figura 8).

O sorotipo C é achado frequente em casos de periodontite em populações asiáticas, conforme Yoshida et al. (2003) e Yang et al. (2005), corroborando estudo de Kim et al. (2009), no qual os mesmos encontraram prevalência de 61,9% desse

sorotipo em uma população coreana de 98 pessoas, sendo que esse resultado aproximou-se do presente estudo, pois o sorotipo C foi diagnosticado em aproximadamente 50% (Figura 2) das amostras, sendo essa diferença estatisticamente significativa, além do mesmo se apresentar em maior concentração juntamente com *C. rectus* e *T. forsythia* (Figura 6).

O sorotipo E, embora menos frequente do que os outros sorotipos, também se faz presente principalmente em casos de periodontite crônica e, segundo Yoshida et al. (2003), parece sofrer influência direta de *P. gingivalis*, já que as amostras de sítios onde prevalecia essa bactéria não apresentava tal sorotipo, ao contrário do sorotipo C, que estava presente em amostras *P. gingivalis* positiva. No presente estudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as bactérias presentes nos mesmos nichos que o sorotipo E, sendo semelhantes às concentrações de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *C. rectus*. Os sorotipos D e F possuem incidência muito pequena no meio intraoral e o sorotipo G ainda não foi suficientemente estudado. Embora tal bactéria seja encontrada com grande frequência em quadros de doença periodontal, não foi possível estabelecer um marcador genético relacionando *A. actinomycetemcomitans* com doença periodontal agressiva em todos os sorotipos, conforme Pinheiro et al. (2011).

O potencial de agressividade da condição periodontal poderá ser maior ou menor dependendo da interação entre as bactérias presentes no periodonto, segundo Rupani et al. (2008) e Casarin et al. (2010), fazendo-se necessário o uso de técnicas que permitam analisar a presença das mesmas quando de uma coleta. Para isso, o teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é de alta fidedignidade e de amplo uso, combinando alta sensibilidade com especificidade na detecção de micro-organismos como *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*,

conforme Riggio et al. (1996) e Vartoukian et al. (2009). Há variantes desse mesmo exame como o PCR em tempo real, exame de alta eficiência na detecção bacteriana em exames intraorais, segundo Yoshida et al. (2003) e Atieh (2008). O exame escolhido no presente trabalho foi o PCR convencional, por apresentar seus resultados baseados em análise por DNA, detectando qualquer traço de bactérias presentes e permitindo, assim, refazer o exame com as mesmas amostras das coletas, conforme Vartoukian et al. (2009).

Baseado na proposta do presente estudo, fazendo uso do PCR convencional, foi comprovado que a prevalência do sorotipo C foi significativamente maior do que dos outros sorotipos independentemente a qual micro-organismo tenha sido relacionado, sendo estatisticamente significante a diferença entre esse sorotipo e o sorotipo A, que foi o segundo mais prevalente, seguido do sorotipo B e por último e com uma prevalência muito menor, o sorotipo E, concordando com estudos de Cortelli et al. (2012). O número de amostragem foi significativo (263), já que são poucos os estudos brasileiros com números próximos a esse, tais como Jardim Júnior et al. (2006), Cortelli et al. (2010) e Roman-Torres et al. (2010). A prevalência de *C. rectus* foi efetivamente mais alta, seguida de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythia*. Os sorotipos D e F não foram encontrados, corroborando estudos de Cortelli et al. (2012). Os índices gengivais (PS e NCI) foram maiores em casos de prevalência maior do sorotipo B, que apresentou maior correlação com quadros de periodontite agressiva. A frequência de *C. rectus* foi maior quando relacionado ao sorotipo C, assim como os sorotipos A e B foram relacionados a *C. rectus* e *T. forsythia* (Figura 8).

7 CONCLUSÕES

O presente estudo está de acordo com estudos prévios demonstrando que a distribuição de sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* foi influenciada pela presença de outros micro-organismos orais. Em particular, observamos uma associação positiva entre o sorotipo A com *C. rectus* e os sorotipos B e C de *A. actinomycetemcomitans* com *C. rectus* e *T. forsythia*.

REFERÊNCIAS

- 1- The American Academy of Periodontology. Glossary of Periodontal Terms. 4^a ed. Chicago: AAP; 2001. 53 p.
- 2- Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 2002;29:260–8.
- 3- Socransky SS, Haffajee AD. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: current concepts. *Journal of Periodontology* 1992 Apr;63(4):322-31.
- 4- Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: Prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* 1997 Jul;68(7):651-66.
- 5- Nonnenmacher C, Mutters R, Jacoby LF. Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Clin Microbiol Infect* 2001 Apr;7(4):213-7.
- 6- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2001 Oct;72(10):1354-63.
- 7- Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J Periodontol* 2006 Mar;77(3):460-71.
- 8- Joshi VM, Vandana KL. The detection of eight putative periodontal pathogens in adult and rapidly progressive periodontitis patients: An institutional study. *Indian J Dent Res* 2007 Jan/Mar;18(1):6-10.

- 9- Feng XH, Zhang L, Meng HX, Xu L, Chen ZB, Shi D, et al. Detection of 3 anaerobic microorganisms in saliva and subgingival plaque of patients with periodontitis. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2009 Feb;41(1):44-8.
- 10- Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol Immunol* 1988;3:1-7.
- 11- Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *J Periodontol* 1992;63:540-7.
- 12- Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Periodont Res* 1996;31:496-501.
- 13- Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Kawada M, Koga T. Development of a 5' Fluorogenic Nuclease-Based Real-Time PCR Assay for Quantitative Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 2003 Feb;41(2):863-6.
- 14- The American Academy of Periodontology. Consensus report. Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. *Ann Periodontol* 1999;1:16-22.
- 15- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 1998;25:134-44.
- 16- Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009;80:1421-32.
- 17- López R, Dahlén G, Retamales C, Baelum V. Clustering of subgingival microbial species in adolescents with periodontitis. *Eur J Oral Sci* 2011 Apr;119(2):141-50.

- 18- Armitage G. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology* 2000 2010;53:70–88.
- 19- Teughels W, Haake SK, Sliepen I, Pauwels M, Eldere JV, Cassiman JJ, et al. Bacteria Interfere with *A. actinomycetemcomitans* Colonization. *J Dent Res* 2007;86(7):611-7.
- 20- Wilson M, Henderson B. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *FEMS Microbiology Reviews* 1995;17(4):365–79.
- 21- Brunner J, Scheres N, Idrissi NBE, Deng DM, Laine ML, Van Winkelhoff AJ, et al. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol* 2010;10:5.
- 22- Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
- 23- Salari MH, Kadkhoda Z. Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis. *Journal of Oral Science* 2004;46(3):157-61.
- 24- Lee JW, Choi BK, Yoo YJ, Choi SH, Cho KS, Chai JK, et al. Distribution of Periodontal Pathogens in Korean Aggressive Periodontitis. *Journal of Periodontology* 2003;74(9):1329-35.
- 25- Casarin RCV, Del Peloso Ribeiro E´, Mariano FS, Nociti FH Jr, Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2010;45:635–42.
- 26- Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include

- V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006;56:2135–46.
- 27- Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci* 2005;113:28–33.
- 28- Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodont* 2005;32(8):860–6.
- 29- Jentsch H, Cachovan G, Guentsch A, Eickholz P, Pfister W, Eick S. Characterization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains in periodontitis patients in Germany. *Clin Oral Invest* 2012 Jan. DOI:10.1007/S00784-012-0672-X.
- 30- Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy VI. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. *Pesq Odont Bras* 2003;17(2):183–8.
- 31- Roman-Torres CVG, Aquino DR, Cortelli SC, Franco GCN, Santos JG, Corraini P, et al. Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Archives of Oral Biology* 2010;55:242–8.
- 32- Kachlany SC. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res* 2010 Jun;89(6):561-70.
- 33- Kilian M, Frandsen EVG, Haubek D, Poulsen K. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontol 2000* 2006;41:1–22.
- 34- Haubek D, Poulsen K, Kilian M. Microevolution and Patterns of Dissemination of the JP2 Clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 2007;75(6):3080-8.

- 35- Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol* 2008;35:346-61.
- 36- Claesson R, Lagervall M, Hoglund-Aberg C, Johansson A, Haubek D. Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden. *J Clin Periodontol* 2011;38:115–21.
- 37- Sakellari D, Katsikari A, Slini T, Ioannidis I, Konstantinidis A, Arsenakis M. Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes and the JP2 clone in a Greek population. *J Clin Periodontol* 2011;38:108–14.
- 38- Van der Reijden WA, Brunner J, Bosch-Tijhof CJ, van Trappen S, Rijnsburger MC, Graaff MPW, et al. Phylogenetic variation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype e reveals an aberrant distinct evolutionary stable lineage. *Infection, Genetics and Evolution* 2010;10:1124–31.
- 39- Kittichotirat W, Bumgarner RE, Asikainen S, Chen C. Identification of the Pangenome and Its Components in 14 Distinct *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Strains by Comparative Genomic Analysis. *PLoS ONE* 2011;6(7):e22420. DOI:10.1371/journal.pone.0022420.
- 40- Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: The 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000 2005;38:72–122.
- 41- Li J, Helmerhorst E, Leone C, Troxler R, Yaskell T, Haffajee A, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of Applied Microbiology* 2004;97:1311–8.
- 42- Bhattacharjee MK, Childs CB, Ali E. Sensitivity of the Periodontal Pathogen, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* at Mildly Acidic pH. *Journal of Periodontology* 2011; Jun;82(6):917-25. DOI: 10.1902/jop.2010.100590.

- 43- Atieh MA. Accuracy of Real-Time Polymerase Chain Reaction Versus Anaerobic Culture in Detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: A Meta-Analysis. J Periodontol 2008;79:1620-9.
- 44- Kim SJ, Park YH, Hong SP, Cho BO, Park JW, Kim SG. The Presence of Bacteria in the Synovial Fluid of the Temporomandibular Joint and Clinical Significance: preliminary study. J Oral Maxillofac Surg 2003;61:1156-61.
- 45- Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. J Clin Microbiol 2000 Jan;38(1):79-84.
- 46- Brage M, Holmlund A, Johansson A. Humoral immune response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. J Periodontal Res 2011;46:170-5.
- 47- Johansson A, Eriksson M, Ahrén AM, Boman K, Jansson JH, Hallmans G, et al. Prevalence of systemic immunoreactivity to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin in relation to the incidence of myocardial infarction. BMC Infectious Diseases 2011;11:55-60.
- 48- Paturel L, Casalta JP, Habib G, Nezri M, Raoult D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. Clin Microbiol Infect 2004;10:98–118.
- 49- Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? Periodontology 2000 2010;54:78-105.
- 50- Chen C, Wang T, Chen W. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes in subgingival plaque from United States subjects. Molecular Oral Microbiology 2010;25:207-14.
- 51- Fujise O, Wang Y, Chen W, Chen C. Adherence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* via serotype-specific polysaccharide antigens in lipopolysaccharides. Oral Microbiol Immunol 2008;23:226–33.

- 52- Rupani D, Izano EA, Schreiner HC, Fine DH, Kaplan JB. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype f O-polysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:127–30.
- 53- Van der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, Van der Velden U, Van Winkelhoff AJ. Java project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. *J Clin Periodontol* 2008;35:487–92.
- 54- Kittichotirat W, Bumgarner R, Chen C. Markedly different genome arrangements between serotype a strains and serotypes b or c strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *BMC Genomics* 2010;11:489-500.
- 55- Kawamoto D, Ando ES, Longo PL, Nunes ACR, Wikstrom M, Mayer MPA. Genetic diversity and toxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:493–501.
- 56- Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Roman-Torres CVG, Franco GCN, Gomez RS, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012 Jul;31(Issue 7):1311-8.
- 57- Pinheiro ET, Kawamoto D, Ota-Tsuzuki C, Almeida LRS, Nunes ACR, Longo PL, et al. Analysis of genotypic variation in genes associated with virulence in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clinical isolates. *J Periodont Res* 2011;46:310–7.
- 58- Kim TS, Frank P, Eickholz P, Eick S, Kim CK. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *J Periodontol* 2009;80:2020-7.
- 59- Thiha K, Takeuchi Y, Umeda M, Huang Y, Ohnishi M, Ishikawa I. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(3):201-7.

- 60- Suzuki N, Nakano Y, Kiyoura Y. Characterizing the specific coaggregation between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype c strains and *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:385–91.
- 61- Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol* 2007;45:3859–69.
- 62- Takada K, Saito M, Tsuzukibashi O, Kawashima Y, Ishida S, Hirasawa M. Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol* 2010 Jun;25(3):200-6.
- 63- Psoter WJ, Ge Y, Russell SL, Chen Z, Katz RV, Jean-Charles G, et al. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in dental plaque samples from Haitian adolescents. *Clin Oral Invest* 2011 Aug;15(4):461-9. DOI: 10.1007/S00784-010-0413-Y.
- 64- Kuboniwa M, Inaba H, Amano A. Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis. *Periodontology* 2000 2010;54:136–59.
- 65- Raslan SA, Alencar CO, Cortelli JR, Cortelli SC, Aquino DR. Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em associação a *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em pacientes periodontais. *Rev Odontol UNESP, Araraquara* 2011 nov./dez.;40(6):304-9.
- 66- Ready D, D’Aiuto F, Spratt DA, Suvan J, Tonetti MS, Wilson M. Disease Severity Associated with Presence in Subgingival Plaque of *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythia*, Singly or in Combination, as Detected by Nested Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2008 Oct;46(10):3380-3.
- 67- Ito AK, Ishihara K, Tomita S, Kato T, Yamada S. Investigation of subgingival profile of periodontopathic bacteria using polymerase chain reaction. *Bull Tokyo Dent Coll* 2010;51(3):139-44.

- 68- Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25(4):229-35.
- 69- Araujo MBW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, et al. Reproducibility of probing depth measurements using a constant force electronic probe: analysis of inter and intra-examiner variability. *J Periodontol* 2003;74(9):1736-40.
- 70- Haffajee AD. Plaque microbiology in (periodontal) health and disease. In: Henderson B, Curtis MA, Seymour RM, Donos N, editors. *Periodontal Medicine and Systems Biology*. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2009. p. 59–76.
- 71- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010;192:5002–17.
- 72- Asikainen S, Dogan B, Turgut Z, Paster BJ, Bodur A, Oscarsson J. Specified species in gingival crevicular fluid predict bacterial diversity. *PLoS ONE* 2010;5:e13589.
- 73- Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 2007;43:133–59.
- 74- Vieira EM, Raslan SA, Wahasugui TC, Avila-Campos MJ, Marvulle V, Gaetti-Jardim Júnior E. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilian Indians from Umutina Reservation, Mato Grosso, Brazil. *J Appl Oral Sci* 2009 Sep/Oct;17(5):440-5.
- 75- Cortelli JR, Roman-Torres CV, Aquino DR, Franco GCN, Costa FO, Cortelli SC. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilians with chronic periodontitis. *Braz Oral Res* 2010 Apr/Jun;24(2):217-23.
- 76- Lafaurie GI, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A, et al. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J Periodontol* 2007 Apr;78(4):629-39.

- 77- Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* 2008 Feb;35(2):106-13.
- 78- Meng S, Zhao L, Yang H, Wu Y, Ouyang Y. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese chronic periodontitis patients and periodontally healthy adults. *Quintessence Int* 2009 Jan;40(1):53-60.
- 79- Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000 1999;20:82–121.
- 80- Jardim Júnior EG, Bosco JM, Lopes AM, Landucci LF, Jardim EC, Carneiro SR. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects and children with gingivitis in two cities of the state of São Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci* 2006 May/Jun;14(3):153-6.
- 81- Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *J Clin Periodont* 2011;38(Suppl. 11):7–16.
- 82- Wu YM, Yan J, Chen LL, Gu ZY. Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007;8:121–31.
- 83- Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009;36:739–49.
- 84- Kelk P, Claesson R, Chen C, Sjöstedt A, Johansson A. IL-1b secretion induced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* is mainly caused by the leukotoxin. *International Journal of Medical Microbiology* 2008;298:529–41.

- 85- Kanasi E, Dogan B, Karched M, Thay B, Oscarsson J, Asikainen S. Lack of Serotype Antigen in *A. actinomycetemcomitans*. J Dent Res 2010 Mar;89:292-6.
- 86- Ioannou I, Dimitriadis N, Papadimitriou K, Sakellari D, Vouros I, Konstantinidis A. Hand instrumentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis: a randomized clinical and microbiological trial. Journal of Clinical Periodontology 2009;36:132–41.
- 87- Vartoukian S, Palmer R, Wade W. Diversity and morphology of members of the phylum “Synergistetes” in periodontal health and disease. Applied and Environmental Microbiology 2009;75:3777–86.
- 88- Atieh MA. Accuracy of Real-Time Polymerase Chain Reaction Versus Anaerobic Culture in Detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: A Meta-Analysis. J Periodontol 2008;79:1620-9.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de informação

CARTA DE INFORMAÇÃO

Caro indivíduo,

A doença periodontal é aquela doença que acontece na gengiva deixando os dentes moles sem formar cavidade. A doença de gengiva também causa mau hálito (cheiro ruim na boca) e sangramento ao escovar os dentes, comer ou dormir. A placa dental (massa branca e mole) e o tártaro (massa dura) que provocam a doença de gengiva são formados por muitas bactérias. Esse estudo chamado **Distribuição de sorotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e sua relação com patógenos periodontais**, quer verificar a presença de alguns desses micro-organismos encontrados na boca de pessoas com doença de gengiva. E, ver a relação entre eles. Para isso, será preciso coletar um pouco de material da boca. O material é coletado com uma ponta de papel e o exame não causa dor ou incômodo. Todas as pessoas que participarem do estudo receberão tratamento para os problemas de gengiva. Se a pessoa precisar de outros tratamentos como canal ou obturação, ela será encaminhada para as outras disciplinas do Departamento de Odontologia da UNITAU. Em caso de tratamento que exige serviço de terceiros, como confecção de próteses, cada professor responsável, junto com a Assistente Social, irão estabelecer os preços e o número de vezes para efetuar o pagamento.

Se você não quiser mais participar do estudo, quando desistir, continuará recebendo o tratamento. Você só irá precisar avisar o dentista.

Os resultados dos seus exames serão avaliados junto com os resultados dos outros participantes, e as pessoas de fora não verão quem é você nem os resultados dos seus exames. Mas, você vai saber dos seus resultados.

Não existe risco de você se machucar participando do estudo.

Como pesquisadores responsáveis pelo estudo, estaremos sempre à disposição para você tirar qualquer dúvida. Procure a Clínica de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da UNITAU - Rua Expedicionário Ernesto Pereira, nº 110 – Centro - Taubaté - SP - (012) 225-4147.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli Paulo Roberto Orzechowski

Pesquisadores responsáveis

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ RG
_____, residente à _____

_____, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **Distribuição de sorotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e sua relação com patógenos periodontais**. Discuti com os pesquisadores Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino, Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli e Paulo Roberto Orzechowski sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

_____(__/__/__)

Assinatura do paciente/representante

_____(__/__/__)

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____(__/__/__)

Assinatura dos pesquisadores responsáveis

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Paulo Roberto Orzechowski

Taubaté, março de 2012