



**CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA**

**PERFIL MICROBIOLÓGICO ASSOCIADO AO
POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR DA
VITAMINA D (VDR) EM INDIVÍDUOS
PERIODONTALMENTE SAUDÁVEIS E COM
PERIODONTITE CRÔNICA**

MARIA ANGÉLICA TONIATO BORGES

1º Orientador: Prof.^a Dr.^a Magda Feres

2º Orientador: Prof.^a Dr.^a Luciene Figueiredo

3º Orientador: Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Jr

Guarulhos
2006

MARIA ANGÉLICA TONIATO BORGES

**PERFIL MICROBIOLÓGICO ASSOCIADO AO
POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR DA
VITAMINA D (VDR) EM INDIVÍDUOS
PERIODONTALMENTE SAUDÁVEIS E COM
PERIODONTITE CRÔNICA**

Dissertação apresentada à Universidade
Guarulhos para obtenção do título de
Mestre em Odontologia, Área de
Concentração em Periodontia.

1º Orientador: Prof.^a Dr.^a Magda Feres

2º Orientador: Prof.^a Dr.^a Luciene Figueiredo

3º Orientador: Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Jr

Guarulhos
2006

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Guarulhos

B733p

Borges, Maria Angélica Toniato

Perfil microbiológico associado ao polimorfismo do gene do receptor da vitamina D (VDR) em indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica. / Maria Angélica Toniato Borges – Guarulhos, SP: Universidade Guarulhos, 2005.

63 p.: il.; 30 cm

1 – Orientador: Prof.^a Dra. Magda Feres

2 – Orientador: Prof.^a Dra. Luciene Figueiredo

3 - Orientador: Prof.^o Dr. Rui Barbosa de Brito Jr.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Guarulhos.

1. Periodontite. 2. Genética 3. Microbiologia

CDD 21. ed. 617.634

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Débora Pallos

Prof.^a Dr.^a Magda Feres

Prof.^a Dr.^a Sheila Cortelli

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Guido e Conceição e ao meu querido marido Antonio. Vocês me orientaram, incentivaram, ajudaram e apoiaram. A esses seres tão especiais, todo o meu amor e agradecimento.

Renova-te
Renasce em ti mesmo
Multiplica os teus olhos, para verem mais
Multiplica os teus braços para semeares tudo
Destrói os olhos que tiverem visto
Cria outros, para as visões novas
Destrói os braços que tiverem semeado
Para se esquecerem de colher
Sê sempre o mesmo
Sempre outro
Mas sempre alto
Sempre longe
E dentro de tudo

Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Conceição e Guido, por todo o amor com que sempre me ensinaram, vocês são exemplo de ética, compreensão e dedicação e estiveram ao meu lado em todos os momentos de minha vida, incentivando-me sempre a crescer profissionalmente e a buscar uma vida melhor e digna e acompanham-me com todo carinho, sempre acreditando em mim. Esta conquista é nossa.

Ao meu grande Mestre Dr. Guido Borges, por seus conselhos, seu exemplo de profissionalismo, entusiasmo, dedicação e amor pela profissão que tanto me contagiaram e motivaram a seguir esta linda carreira, receba toda a minha admiração.

Ao meu amado marido Antonio, que com seu amor e companheirismo, me acompanhou nessa jornada, nos momentos difíceis e chuvosos, nas idas e vindas Rio-São Paulo, a qualquer hora, com sua preocupação, amor e respeito por mim e por este trabalho e acima de tudo, compreendendo a importância desta nossa conquista. Sua força e crença em mim me ajudaram a superar os momentos mais difíceis.

Às minhas queridas irmãs Ana Cristina e Mônica, minha cunhada Márcia, meus cunhados Marco e João, meus lindos sobrinhos Ana Carolina, Marco Antonio, Ana Luisa, Arthur, Phoebe e Zowie e a minha sogra Delta, por me apoiarem e entenderem minha ausência em tantos momentos.

À minha dedicada orientadora Prof.^a Dr.^a Magda Feres, por seu exemplo, competência e profissionalismo que tanto admiro. Exemplo este a ser seguido. Sua grande experiência muito me enriqueceu.

À minha também dedicada orientadora Prof.^a Dr.^a Luciene Figueiredo, pelo seu empenho e auxílio em tantos momentos. Agradeço também por sua constante presença e contribuição inestimável.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior por sua atenção e cuidados dispensados a esse trabalho. Também por me fazer adorar Campinas.

Ao meu orientador de coração Prof. Dr. Jamil Awad Shibli que nunca mediu esforços em ajudar este trabalho e por sua generosidade ao ensinar.

À Sonia Motta, essa incansável transmissora de saberes, com quem muito tenho aprendido.

À todos da Comissão de Saúde Primária da Abenepi, por seu carinho, apoio e compreensão da minha ausência.

A todas as minhas amigas que me incentivaram e também puderam compreender minha ausência.

Ao meu amigo Joel Alves por sempre ter me incentivado a buscar o que sonhava, me motivando e fazendo acreditar que não importa a dificuldade do caminho, pois vale a pena seguir quando se acredita de coração no que faz.

Ao meu querido amigo Sérgio, que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos do mestrado, me ajudando e sendo um grande amigo, sempre atencioso e digno, exemplo de preciosismo em tudo o que faz.

Aos meus amigos de mestrado, Katia, Thales, Sauro e Adriano, por terem dividido tantos conhecimentos e gargalhadas, recebam todo meu carinho.

Aos demais professores do curso de mestrado acadêmico em Odontologia, Prof.^a Dr.^a Sheila Cortelli, Prof.^a Dr.^a Poliana Duarte, Prof.^a Dr.^a Cristiane M. Amaral, Prof. Dr. José Augusto Rodrigues, Prof. Dr. Saulo Geraldeli, Prof. Dr. Marcelo W. Araujo e Prof. Dr. Sérgio Costa pelos ensinamentos transmitidos e por todas as contribuições que foram dadas.

Ao Marcelo por sua ajuda na realização deste trabalho, sua contribuição foi de grande valor.

Aos meus amigos Débora, José Augusto e Germano por seus conselhos e apoio nessa trajetória.

A bióloga Izilvânia Q. Barreto por seu esmero e empenho para que este trabalho pudesse ser realizado.

A minha secretária Ana, que tanto me ajudou nesses 2 anos de mestrado, não medindo esforços para ajudar não só a mim, mas aos pacientes também.

A secretária do curso de mestrado Fernanda por sua dedicação ao curso de mestrado e aos alunos.

A Cíntia por sua indispensável ajuda na clínica, pois sem ela tudo teria sido muito mais trabalhoso.

A Adriana, também por sua indispensável ajuda na clínica.

A todos os pacientes que gentilmente se dispuseram a participar deste trabalho, dedicando horas de suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

A minha fiel escudeira Sílvia por todos os seus cuidados.

Obrigada a todos!

RESUMO

O objetivo deste estudo transversal foi avaliar a composição da microbiota subgengival de indivíduos com periodontite crônica e indivíduos periodontalmente saudáveis e investigar a possível associação entre doença periodontal e o polimorfismo no gene do receptor da Vitamina D (VDR). Foram selecionados 60 indivíduos, sendo 30 periodontalmente saudáveis e 30 com periodontite crônica. Os parâmetros clínicos de profundidade à sondagem (PS - mm), nível clínico de inserção (NCI - mm), presença ou ausência de sangramento à sondagem (0,1), placa supragengival visível (0,1) e supuração (0,1) foram mensurados em 6 sítios por dente. Amostras de placa subgengival foram coletadas de 6 sítios méso-vestibulares no grupo Saudável, e 6 sítios interproximais não-contíguos com PS e NCI ≥ 5 mm no grupo Periodontite, e avaliadas por meio do teste *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para a presença de 38 espécies bacterianas. Para a avaliação do polimorfismo no gene do VDR amostras de células epiteliais foram obtidas da mucosa jugal de cada indivíduo por meio de bochecho com solução de glicose a 3 %, o DNA foi extraído, amplificado utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido da digestão com enzima de restrição *TaqI* (técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP*). Os produtos foram analisados em gel de poli-acrilamida a 10% e corados por prata. Diferenças microbiológicas entre os dois grupos foram avaliadas por meio do Teste U de Mann-Whitney. O grupo de indivíduos periodontalmente saudáveis apresentou níveis médios totais de microrganismos significativamente menores ($0,3 \times 10^7 \pm 0,7 \times 10^7$) do que os indivíduos com periodontite crônica ($4,5 \times 10^7 \pm 2,9 \times 10^7$). O complexo vermelho somou 30,2% das espécies avaliadas nos indivíduos com periodontite crônica, e 4,8% nos saudáveis ($p < 0,05$). Nos indivíduos com periodontite os patógenos somaram 64,2% e as espécies benéficas 25,7% da microbiota avaliada, enquanto que nos indivíduos saudáveis essas proporções foram de 27,1% e 70,2%, respectivamente. Em relação à ocorrência de polimorfismo no gene do VDR, observou-se que o genótipo "Tt" foi mais prevalente no grupo Periodontite (60%) do que no grupo Saudável (30%), enquanto que as prevalências do genótipo "TT" foram 23,3% e 53,3%, respectivamente (Teste Qui-quadrado, $p < 0,05$). Não foi encontrada diferença estatística significativa entre a frequência dos alelos "T" e "t" nos dois grupos. Não houve diferença na composição da microbiota subgengival entre os genótipos do VDR avaliados, tanto no grupo Saudável quanto no grupo Periodontite. Em conclusão, os perfis de colonização microbiana de indivíduos brasileiros periodontalmente saudáveis ou com periodontite crônica são distintos. Além disso, o genótipo "Tt" foi associado à doença periodontal.

Palavras-chave: microbiota subgengival, genética, polimorfismo, biologia molecular, vitamina D, receptor.

ABSTRACT

The aim of this cross-sectional study was to evaluate the composition of the subgingival microbiota of subjects with chronic periodontitis and periodontally healthy subjects, and to investigate the association between periodontal disease and the polymorphism of the vitamin D receptor gene (VDR) in both groups. Sixty subjects were selected, 30 with periodontal health and 30 with chronic periodontitis. The clinical parameters of probing depth (PD,mm), clinical attachment level (CAL,mm), bleeding on probing (0,1), plaque accumulation (0,1) and suppuration (0,1) were measured at 6 sites per tooth. Subgingival plaque samples were collected from 6 mesio-buccal sites in the Healthy group and 6 non-contiguous interproximal sites with PD and CAL (≥ 5 mm) in the Periodontitis group and analyzed for the content of 38 bacterial species using the Checkerboard DNA-DNA Hybridization technique. For the evaluation of the VDR gene polymorphism, samples of epithelial cells were obtained from the buccal mucosa using a mouthwash containing 3% of glucose. Subsequently, the DNA was extracted, amplified using the polymerase chain reaction technique (PCR), followed by its digestion with the *TaqI* restriction enzyme (*Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP*). The products were analyzed in 10% polyacrylamide gel electrophoresis and stained by rapid silver staining method. The microbiological differences between the two groups were evaluated using the Mann-Whitney U Test. The healthy subjects presented significantly lower levels ($0,3 \times 10^7 \pm 0,7 \times 10^7$) of total microbial counts in comparison with subjects with chronic periodontitis ($4,5 \times 10^7 \pm 2,9 \times 10^7$). The red complex represented 30,2% of the species evaluated in the chronic periodontitis subjects and 4,8% in the healthy subjects ($p < 0,05$). In subjects with chronic periodontitis the periodontal pathogens summed 64,2% and the beneficial species 25,7%. Conversely, in the healthy subjects, these proportions were 27,1% and 70,2%, respectively. Regarding the occurrence of the VDR polymorphism it was observed that the "Tt" genotype was more prevalent in the Periodontitis group (60%) than in the Healthy group (30%), while the prevalence of the "TT" genotype were 23,3% and 53,3%, respectively (Chi-square test, $p < 0,05$). It was not found significant statistical difference between the frequencies of the alleles "T" and "t" in the two groups. No difference was found in the composition of the subgingival microbiota among the VDR genotypes evaluated for the Healthy and Periodontitis groups. In conclusion, Brazilian subjects with chronic periodontitis and periodontally healthy have different profiles of microbial colonization. In addition, the "Tt" genotype was associated with periodontal disease.

Key-words: subgingival microbiota, genetics, polymorphisms, molecular biology, vitamin D, receptor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA separadas por complexos bacterianos.....	18
Tabela 2. Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival	24
Tabela 3. Média (\pm dp) dos parâmetros clínicos nos grupos Saudável e Periodontite.....	28
Tabela 4. Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) <i>TaqI</i> do gene do VDR entre indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica do <i>Minislot</i> (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e deposição das amostras de biofilme subgengival (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>).....	20
Figura 2. Representação gráfica do <i>Miniblotter</i> (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>).....	21
Figura 3. Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>).....	22
Figura 4. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>). Nesta figura estão apresentadas 40 bactérias, e as amostras de biofilme são de todos os dentes de um mesmo indivíduo.....	23
Figura 5. Termociclador	26
Figura 6. Eletroforese.....	26
Figura 7- Gel de poliacrilamida, corado por prata, evidenciando resultado da RFLP do gene do receptor da vitamina D (VDR- <i>TaqI</i>). Indivíduo homocigoto para o alelo t (t/t), indivíduo homocigoto para o alelo T (T/T), indivíduo heterocigoto (T/t) e padrão de massa molecular (P).....	27
Figura 8. Média da contagem total ($\times 10^7 \pm dp$) das espécies bacterianas analisadas por meio do teste diagnóstico <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	29
Figura 9. Gráfico de barras das médias de contagem ($\times 10^6 \pm dp$) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos indivíduos dos grupos Saudável e Periodontite	30
Figura 10. Gráfico de barras da média do percentual de sítios colonizados por cada uma das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos indivíduos dos grupos Saudável e Periodontite. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Socransky <i>et al.</i> , 1998 e Socransky & Haffajee, 2002	32

- Figura 11.** Gráfico setorial da média das proporções dos complexos microbianos descritos por Socransky *et al.*, 1998 e Socransky & Haffajee, 2002, presente nas amostras de biofilme subgingival presente nos indivíduos dos grupos Saudável e Periodontite..... 33
- Figura 12.** Gráfico de barras das médias de contagem ($\times 10^6 \pm$ desvio padrão) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival nos indivíduos dos grupos Saudável e Periodontite, de acordo com o genótipo “TT”, “Tt” ou “tt” 36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
1.1 Microbiologia da doença periodontal	1
1.2 Fatores genéticos e doença periodontal	6
1.2.1 <i>Receptor da vitamina D (VDR)</i>	9
2 PROPOSIÇÃO	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Seleção da amostra	13
3.2 Critérios de inclusão	13
3.3 Critérios de exclusão	14
3.4 Avaliação clínica	14
3.4.1 <i>Calibração dos examinadores</i>	14
3.4.2 <i>Parâmetros clínicos</i>	14
3.5 Avaliação microbiológica	15
3.5.1 <i>Seleção dos sítios-teste</i>	15
3.5.2 <i>Cepas bacterianas e condições de crescimento</i>	16
3.5.3 <i>Isolamento do DNA e preparo das sondas</i>	16
3.5.4 <i>Coleta de amostras de biofilme subgengival</i>	19
3.5.5 <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	19
3.6 Avaliação genética	24
3.6.1 <i>Análise de polimorfismo genético</i>	24
3.7 Análise estatística	27
3.7.1 <i>Dados microbiológicos</i>	27
3.7.2 <i>Dados genéticos</i>	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Perfil epidemiológico e clínico dos participantes do estudo	28
4.2 Resultados microbiológicos	28
4.3 Resultados genéticos	34
4.4 Associação entre o polimorfismo genético e a condição periodontal	34

5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	59

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença periodontal é uma infecção causada por bactérias presentes no biofilme oral (Løe *et al.*, 1965, Page, 1986; MacFarlane *et al.*, 1988; Socransky & Haffajee, 1994; Haffajee & Socransky, 1994, Haffajee & Socransky, 2005; Zambon, 1996; Kornman *et al.*, 1997; Moore, 1997; Socransky & Haffajee, 2005; Sakamoto *et al.*, 2005). Os diferentes graus de destruição tecidual associados à periodontite são derivados de uma complexa interação entre a natureza da microbiota presente e a resposta do hospedeiro, incluindo fatores genéticos, e ainda fatores ambientais (Socransky & Haffajee, 1994; Haffajee & Socransky, 2001; Schenkein, 2002; Nares, 2003).

A identificação de grupos populacionais com maior suscetibilidade à doença periodontal tem exigido informações adicionais a respeito dos microrganismos periodontopatogênicos, assim como dos mecanismos envolvidos na patogênese desta infecção (Barnett *et al.*, 1986). Løe *et al.* (1986) realizaram um clássico estudo longitudinal sobre a história natural da doença periodontal em plantadores de chá do Sri Lanka que não possuíam acesso a tratamento dentário. Cento e sessenta e um indivíduos com idade variando entre 14 e 31 anos no exame inicial, realizado em 1970, foram avaliados 5 vezes em um período de 15 anos. Os autores observaram que apenas 8% da população estudada apresentaram progressão rápida de periodontite, 81% progressão moderada e 11% não apresentaram progressão de doença, somente gengivite.

A percepção de que os indivíduos apresentam variados riscos em desenvolver doença periodontal, e o fato da presença de bactérias específicas ser condição primordial para a instalação da doença sugerem que a realização de estudos que avaliem fatores genéticos e sua correlação com a microbiota subgengival são de grande valia para o melhor entendimento destas infecções.

1.1. Microbiologia da doença periodontal

A infecção periodontal é iniciada e perpetuada por um pequeno grupo de bactérias predominantemente gram-negativas anaeróbias que colonizam a região subgengival (Page, 1986; MacFarlane *et al.*, 1988; Socransky *et al.*, 1991; Socransky & Haffajee, 1994; Moore & Moore, 1994; Haffajee & Socransky, 1994; Zambon,

1996; Kornman *et al.*, 1997; Nishihara & Koseki, 2004; Socransky & Haffajee, 2005; Sakamoto *et al.*, 2005). O estudo clássico de Løe *et al.* (1965) demonstrou que o acúmulo de placa bacteriana na ausência de métodos de higiene bucal, em indivíduos saudáveis, por um período de 21 dias, levava à instalação de um processo inflamatório gengival e que a posterior reinstalação deste hábito era capaz de reverter o processo inflamatório. Este estudo determinou o caráter infeccioso da doença periodontal e estabeleceu o conceito que mais tarde foi denominado por Loesche (1976), como “Hipótese da placa não-específica”. Acreditava-se que qualquer microrganismo presente no ambiente subgengival poderia contribuir para a destruição tecidual.

Estudos epidemiológicos conduzidos na década de 70 e 80 sugeriram que o desenvolvimento de doença periodontal não estava necessariamente relacionado à quantidade de placa presente. Estas pesquisas indicaram que apenas certos indivíduos ou sítios exibiam perda de inserção e que populações do Sri Lanka (Løe *et al.*, 1986); África do Sul (Reddy *et al.*, 1986) e Quênia (Baelum *et al.*, 1988) possuíam grandes quantidades de cálculo e placa e pouca ou nenhuma perda de inserção periodontal.

A partir daí, diversos estudos microbiológicos foram conduzidos na tentativa de determinar as espécies ou grupos de espécies associados com cada uma das manifestações clínicas das infecções periodontais (Tanner *et al.*, 1979; Haffajee & Socransky, 1994; Socransky *et al.*, 1998). Retomou-se então o conceito da especificidade microbiana da doença periodontal, que foi então denominado de “Hipótese da Placa Específica” (Loesche, 1976).

Vários foram os métodos utilizados para a identificação dos microrganismos bucais. Microscopias de contraste de fase e de campo escuro apresentavam limitações como a não diferenciação das espécies bacterianas (Loesche *et al.*, 1985). O método de cultura por sua vez, avalia um número limitado de amostras e espécies bacterianas devido ao fato de ser extremamente custoso e trabalhoso. Com isso, foram desenvolvidas técnicas imunológicas e de biologia molecular para o diagnóstico microbiológico. Dentre essas técnicas, não-dependentes da viabilidade do microrganismo para sua detecção, destacam-se: anticorpos monoclonais (Kamyia *et al.*, 1994), oligonucleotídeos sintéticos, como os utilizados na “Reação em Cadeia da Polimerase” – PCR (Okada *et al.*, 2001) e sondas de DNA (Socransky *et al.*, 1994). Esses métodos solucionaram grande parte

dos problemas relacionados ao cultivo dos microrganismos, principalmente aqueles com maiores exigências nutricionais.

O método *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foi desenvolvido por Socransky *et al.* (1994) e utiliza sondas de DNA para a identificação de até 40 espécies bacterianas em 28 amostras de biofilme por teste, viabilizando estudos de grande porte em periodontia. Este método tem utilizado com sucesso para a avaliação da complexa microbiota da periodontite crônica, presente nos biofilmes subgingival e supragingival (Haffajee *et al.*, 1998; Socransky *et al.*, 1998; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000 (a), (b); Feres *et al.*, 2004; Haffajee *et al.*, 2004; Haffajee & Socransky, 2005) e para a avaliação dos efeitos de diversas terapias periodontais (Feres *et al.*, 1999a e b; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000 (c); Feres *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2005; Colombo *et al.*, 2005).

Socransky *et al.* (1998), estudando a microbiologia da doença periodontal, descreveram a presença de 5 complexos microbianos em 13.261 amostras de placa subgingival de 185 indivíduos adultos, 20 indivíduos periodontalmente saudáveis e 160 com periodontite crônica. Posteriormente foi descrito mais um complexo microbiano, o complexo azul (Socransky & Haffajee, 2002). Quatro desses complexos (verde, amarelo, roxo e azul) abrigam diversas espécies consideradas benéficas ou compatíveis com o hospedeiro. O chamado complexo verde é formado por 3 espécies de *Capnocytophaga* (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea* e *Capnocytophaga sputigena*), *Eikenella corrodens* e *Actinobacillus actinomycetecomitans* sorotipo a. O complexo amarelo é formado por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*; e o complexo azul por espécies de *Actinomyces*: *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* genoespécie 1 e *Actinomyces naeslundii* genoespécie 2. O complexo roxo é composto por *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. Os grupos bacterianos que abrigam a maior parte dos patógenos periodontais são o laranja, e principalmente o vermelho. O complexo vermelho é composto pelas espécies *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* e o complexo laranja é composto de subespécies de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Micromonas micros*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*. Este estudo demonstrou a existência de relações entre os complexos, aonde os grupos

amarelo, verde, roxo e azul seriam colonizadores primários, em seguida haveria a colonização do complexo laranja e por último o complexo vermelho. O aumento da profundidade à sondagem e sangramento à sondagem foi fortemente associado com a presença das espécies do complexo vermelho e, em certa extensão, do complexo laranja, sugerindo que estas espécies bacterianas têm um importante papel na patogênese da infecção periodontal.

Existe uma forte evidência na literatura do papel do complexo vermelho e de algumas espécies do complexo laranja na etiologia e progressão das doenças periodontais. Esses microorganismos são encontrados com maior frequência e em níveis mais elevados em doença do que em saúde periodontal. Esses dados estão bem fundamentados na literatura por estudos que utilizaram PCR (Ashimoto *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2000; Griffen *et al.*, 1998; Klein & Gonçalves, 2003; Kumar *et al.*, 2003; Mayanagi *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 2001), cultura (Haffajee & Socransky, 1994), *real-time* PCR (Kuboniwa *et al.*, 2004) sondas de DNA (Albandar *et al.*, 1997), técnicas imunológicas (Chaves *et al.*, 2000; Di Murro *et al.*, 1997; Gmur & Thurnheer 2002; Simonson *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 2004) e *Checkerboard DNA-DNA hybridization* (Haffajee *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2004; Socransky & Haffajee, 2005; Haffajee *et al.*, 2005). Alguns desses estudos demonstram ainda que os microorganismos do complexo vermelho estão em níveis extremamente baixos em indivíduos periodontalmente saudáveis (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000 (b); Li *et al.*, 2004). Uma outra informação interessante em indivíduos com periodontite, é que sítios rasos (<4mm) e sem sangramento mostram uma quantidade substancialmente maior de patógenos periodontais do que esses mesmos sítios rasos de indivíduos saudáveis (Riviere *et al.*, 1996; Haffajee *et al.*, 1999; Socransky & Haffajee, 2005). A melhora clínica periodontal está diretamente relacionada à diminuição das espécies dos complexos laranja e, principalmente, vermelho, e a concomitante colonização por espécies benéficas dos complexos amarelo, roxo, verde e azul dos sítios tratados (Socransky *et al.*, 2002). Por outro lado, a presença dessas espécies, ou a persistência delas após a terapia aumentam o risco a futura perda de inserção (Hamlet *et al.*, 2004; Tanner *et al.*, 1998; Rams *et al.*, 1996; Haffajee *et al.*, 1995; Haffajee *et al.*, 1996; Chaves *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2001).

Recentemente, diferenças na composição da microbiota subgengival entre indivíduos de diferentes localizações geográficas também têm sido relatadas (Ali *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 2000; Haffajee *et al.*, 2004). Haffajee *et al.*, em 2004

observaram diferenças importantes na composição do biofilme subgengival de pacientes com periodontite crônica de 4 países: Brasil, Chile, Suécia, e Estados Unidos da América (EUA). Os resultados demonstraram importantes diferenças na composição da microbiota subgengival dos 4 países, principalmente em relação aos microrganismos do complexo vermelho. As proporções de contagem de sondas de DNA estavam significativamente aumentadas para *P. gingivalis* na população Chilena e para *T. denticola* na população Brasileira. Já a população Sueca mostrou proporções extremamente baixas desses dois patógenos. A seguir, em 2005(a), Haffajee *et al.* avaliaram a diferença da microbiota subgengival de indivíduos periodontalmente saudáveis ou que exibiam pouca perda de inserção na Suécia e nos EUA. Os autores utilizaram a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e verificaram que todas as 40 espécies bacterianas foram detectadas em amostras de indivíduos dos 2 países. Foi observado ainda que 5 espécies estavam em maior porcentagem em indivíduos suecos do que em americanos (*A. naeslundii* sorotipo1, *S. sanguinis*, *E. corrodens*, *T. forsythia* e *P. melaninogenica*). Por outro lado, *L. buccalis* estava significativamente elevado em americanos. Os resultados deste estudo indicaram a diferença nos padrões de colonização dessas 40 espécies bacterianas entre esses 2 países e ambos os grupos apresentaram proporção média do complexo vermelho inferior a 4 % da microbiota.

Uma vez que alguns estudos têm sinalizado divergências entre a microbiota de diferentes áreas geográficas, seria fundamental que outras investigações fossem conduzidas neste sentido. A maioria dos estudos que avaliaram a composição do biofilme dental associado a indivíduos periodontalmente saudáveis e doentes foi conduzida em países desenvolvidos e diversas formas de terapias periodontais foram instituídas a partir de dados gerados por essas pesquisas e extrapolados para diversas populações. Poucos estudos compararam sistematicamente a composição da microbiota subgengival de indivíduos brasileiros periodontalmente saudáveis ou doentes (Avila Campos & Velásquez-Meléndez, 2002; Colombo *et al.*, 2002). O esclarecimento do perfil microbiano dentro das diversas populações, ou mesmo de diferentes regiões dentro do mesmo país, pode auxiliar na implementação de terapias periodontais mais específicas.

1.2. Fatores genéticos e doença periodontal

Apesar do grande volume de conhecimento relativo à participação de diversos patógenos na etiologia das doenças periodontais, existem muitos fatores secundários sistêmicos, que podem alterar a resistência dos tecidos periodontais à agressão provocada pelas bactérias. Esses fatores sistêmicos e os mecanismos pelos quais eles podem influenciar o processo patológico de iniciação e/ou progressão da doença periodontal inflamatória não são totalmente compreendidos (Page & Kornman, 1997). Um fator de risco pode ser definido como um fator ambiental, comportamental ou biológico que, se presente, aumenta diretamente a probabilidade da doença ocorrer e se ausente ou removido, reduz essa probabilidade (AAP, 1996; Ramseier, 2005).

Diversos fatores como, por exemplo, o tabagismo (Grossi *et al.*, 1997; Albandar *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2005), diabetes (Grossi & Genco, 1998), estresse (Merchant *et al.*, 2003), AIDS (Gonçalves *et al.*, 2005), anormalidades em neutrófilos (Schenkein *et al.*, 1991), osteoporose (Jeffcoat *et al.*, 2003), síndromes genéticas (Firatli *et al.*, 1996; Figueiredo *et al.*, 2000) e polimorfismos em genes específicos (Kornman *et al.*, 1997; Brito Jr *et al.*, 2004) têm sido estudados como possíveis fatores de risco para a doença periodontal.

Os primeiros estudos que estabeleceram uma correlação entre fatores genéticos e doença periodontal foram aqueles realizados em gêmeos. Michalowicz *et al.*, (1991) estudaram 63 gêmeos monozigóticos que cresceram juntos, 33 gêmeos dizigóticos do mesmo gênero também criados juntos e 14 gêmeos monozigóticos criados separados. Foi identificado um componente genético significativo ($p < 0,05$) para gengivite, profundidade de sondagem, perda de inserção clínica e placa, com base nas variações observadas intra-pares ou em estimativas de hereditariedade. Os autores sugeriram que entre 38% a 82% da variação dessas medidas periodontais na população estudada podem ser atribuídas a fatores genéticos.

Em infecções multifatoriais, como a periodontite crônica, os polimorfismos em genes podem ser possíveis modificadores da doença. Em periodontite, isto significa que apesar da bactéria ter que estar presente para desencadear o início da perda de inserção, os modificadores podem alterar a severidade e a velocidade de

progressão da doença e resposta à terapia (Page & Kornman, 1997). As variantes alternativas da informação genética em um determinado locus do gene são chamadas de alelos. Para muitos genes, há uma única versão que prevalece, presente na maioria das pessoas, chamado de alelo normal ou selvagem. As outras versões do gene são os alelos mutantes, que diferem do alelo selvagem por mutação, uma mudança permanente na seqüência de nucleotídeos ou disposição do DNA. Se existirem pelo menos dois alelos relativamente comuns daquele locus, cuja frequência é maior que 1% na população este é dito como exibindo um polimorfismo (Nussbaum *et al.*, 2002). É importante destacar que polimorfismos estão dentro de um contexto de normalidade, ou seja, são mecanismos pelos quais indivíduos podem exibir variações dentro de uma extensão considerada biologicamente normal (Kornman *et al.*, 1997).

Estudos sobre polimorfismos genéticos têm se mostrado uma linha de pesquisa promissora na procura por fatores de suscetibilidade à doença periodontal (Long *et al.*, 1987; Beaty *et al.*, 1987; Boughman *et al.*, 1992; Marazita *et al.*, 1994; Michalowicz, 1994; Page & Kornman, 1997; Kornman *et al.*, 1997; Engebretson *et al.*, 1999; Hennig *et al.*, 1999; Wilson & Nunn, 1999; Socransky *et al.*, 2000; McDevitt *et al.*, 2000; Armitage *et al.*, 2000; Michalowicz *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2001; Yoshihara *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002; Meisel *et al.*, 2002; Loos *et al.*, 2005; Greenstein & Hart, 2002; Inagaki *et al.*, 2003; Meisel *et al.*, 2003; Tachi *et al.*, 2003; Meisel *et al.*, 2004; Brito Jr *et al.*, 2004; Holla *et al.*, 2004).

Os estudos pioneiros analisaram polimorfismos em genes de mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-1 (IL-1) α e β (Kornman *et al.*, 1997; McGuire & Nunn, 1999; Diehl *et al.*, 1999; McDevitt *et al.*, 2000, De Sanctis & Zucchelli, 2000, Socransky *et al.*, 2000; Cattabriga *et al.*, 2001; Meisel *et al.*, 2002; Meisel *et al.*, 2003; Meisel *et al.*, 2004). Outros mediadores também têm sido estudados: o fator de necrose tumoral α (TNF α) (Engebretson *et al.*, 1999; Craandijk *et al.*, 2002), a interleucina 4 (IL-4) (Scarel-Caminaga *et al.*, 2003) e a interleucina 6 (IL-6) (Trevilatto *et al.*, 2003; Holla *et al.*, 2004).

As interleucinas são um grupo de mediadores químicos que parecem desempenhar um papel central na patogênese da periodontite. São citocinas pró-inflamatórias inicialmente liberadas por macrófagos, e sinalizam outras células a produzirem prostaglandinas (PG) e metaloproteinases (MMPs). As PG têm sido associadas à destruição óssea e as MMPs com a indução da degradação do tecido

conjuntivo (Page, 1991; Page *et al.*, 2000). Os níveis elevados de IL-1 β no fluido gengival e nos tecidos têm sido associados à destruição dos tecidos periodontais (Tatakis, 1993; Kornman *et al.*, 1997; Kornman & Di Giovine, 1998; McGuire & Nunn, 1999; Diehl *et al.*, 1999).

Kornman *et al.* (1997), em um primeiro estudo analisaram a relação entre polimorfismos nos genes da IL-1 (IL-1A, IL-1B e IL-RN) e TNF α em indivíduos caucasianos com mais de 35 anos e portadores de periodontite crônica. Esta amostra populacional foi dividida em 3 grupos: periodontite leve, moderada e severa. O grupo com periodontite severa apresentou 58,1% de fumantes comparados com 10,2 % e 11,9% nos grupos de indivíduos com periodontite moderada e leve, respectivamente. Nos indivíduos não-fumantes foi observada uma forte associação entre a severidade da periodontite e a presença do composto genotípico para IL-1 (IL-1A -889, IL-1B +3953, ambos com alelo 2, alelo menos freqüente), denominado genótipo-positivo. Nos indivíduos fumantes, a doença periodontal severa não estava correlacionada com o genótipo. Considerando todos os participantes do estudo, 36% eram genótipo-positivo. Este estudo demonstrou que os marcadores genéticos específicos relacionados com o aumento da produção de IL-1 podem ser um forte indicador de suscetibilidade a periodontite severa em adultos.

Engbretson *et al.* (1999) testaram se os níveis de IL-1 α , IL-1 β e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) estavam correlacionados com a periodontite crônica em indivíduos considerados genótipo-positivo (polimorfismo do gene da IL-1A - 889 e polimorfismo do gene da IL-1B +3953, ambos com alelo 2). Foi concluído que a IL-1 β elevada no fluido gengival em sítios rasos e a persistência da IL-1 β no fluido após terapia inicial representam um fator de risco para a periodontite. Os autores concluíram também que um maior monitoramento dos níveis de IL-1 β no fluido gengival pode ser um caminho para a avaliação da efetividade da terapia.

Socransky *et al.* (2000) avaliaram parâmetros microbiológicos associados com o polimorfismo do gene da IL-1 em 108 indivíduos. A avaliação microbiológica foi feita por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para 40 espécies bacterianas e amostras de sangue foram coletadas para análise dos polimorfismos dos genes da IL-1A (+4845) e da IL-1B (+3954). Estes autores sugeriram que os indivíduos genótipo-positivo (IL-1A +4845, IL-1B +3954, ambos com alelo 2, alelo menos freqüente) apresentaram níveis elevados de espécies do complexo vermelho

e laranja. Foram detectadas contagens significativamente maiores de *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, subespécies de *F. nucleatum*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *S. constellatus*, *S. gordonii* e *S. intermedius* em bolsas periodontais >6 mm dos indivíduos genótipo-positivos quando comparadas com os indivíduos genótipo-negativos.

Armitage *et al.* (2000), em um estudo sobre a prevalência do polimorfismo no genes da IL-1 em 300 indivíduos chineses, encontraram uma prevalência baixa de periodontite associada ao polimorfismo composto para IL-1A e IL-1B (2,3%) comparado a estudo feito em caucasianos (36%) (Kornman *et al.*, 1997). Os autores questionaram a utilidade da associação genotípica dos alelos 2 de ambos IL-1A +4845 e IL-1B +3954 (genótipo-positivo) como um método para determinação de suscetibilidade de indivíduos chineses à periodontite crônica.

Outros polimorfismos também já foram relacionados à doença periodontal como o do gene da interleucina-6 (Holla *et al.*, 2004), do receptor Fc γ da imunoglobulina G (Colombo *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2001; Yoshihara *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2002) e do receptor da vitamina D (Hennig *et al.*, 1999; Uygur *et al.*, 2002; Britto Jr *et al.*, 2004).

1.2.1 Receptor da vitamina D (VDR)

A vitamina D desempenha funções em uma variedade de ações biológicas como homeostase do cálcio, proliferação e diferenciação celular, e propriedades imunoregulatorias (Hayes *et al.*, 2003). Além disso, pode ter funções antiinflamatórias, como a redução de citocinas produzidas pelas células T e da produção de imunoglobulinas pelas células B (Daniel *et al.*, 2005). Na homeostase óssea e no metabolismo ósseo, acredita-se ser a vitamina D o principal fator regulatório (Walters, 1992), uma vez que a sua deficiência causa raquitismo caracterizado pelo retardo do crescimento, formação óssea defeituosa e hipocalcemia (Kato, 2000).

A maioria das ações biológicas da vitamina D é exercida por meio do seu receptor (VDR) presente no núcleo celular. Este receptor pertence a superfamília de receptores nucleares hormonais e funciona como um fator de transcrição ativado para mediar efeitos genômicos do hormônio (Peterlik & Cross, 2005). A forma

hormonal da vitamina D, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, é gerada por meio de duas etapas de hidroxilações, uma feita no fígado e a outra no rim (Kato, 2000), e posteriormente se liga ao receptor nuclear. Este complexo age como uma chave de ligação que irá ativar a expressão do gene do VDR (Kato, 2000).

O gene do receptor da vitamina D está localizado no cromossomo 12 e consiste em 11 éxons. Quatro polimorfismos têm sido freqüentemente encontrados no gene do VDR, detectados pela presença ou ausência do sítio de restrição. São eles: *Fok I* no segundo éxon, *BsmI* e *Apal* (Morrison *et al.*, 1992) no íntron 8 e *TaqI* no éxon 9 (Gennari *et al.*, 1997).

Um dos principais avanços no desenvolvimento da clonagem molecular foi a descoberta, no início da década de 70, das endonucleases de restrição bacterianas (ou enzimas de restrição), que reconhecem seqüências específicas no DNA, clivando-o neste sítio (Nussbaum *et al.*, 2002). A técnica que utiliza essas enzimas para detecção de sítios polimórficos chama-se *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs).

A forma mais comum de polimorfismo, o *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), representa uma mudança em um único par de base no DNA (Nielsen, 2004). O SNP pode afetar a função do gene, influenciando a produção de RNA mensageiro, e levando a mudanças na expressão, estrutura e função da proteína. Uma substituição de uma base nitrogenada T para C na posição 1056 no éxon 9 do gene do VDR, cria o sítio de restrição para a *TaqI*.

Polimorfismos no gene do VDR têm sido associados com diversas alterações sistêmicas como aumento no risco de desenvolver câncer de próstata (Taylor *et al.*, 1996), câncer de mama (Welsh *et al.*, 2003), doenças coronarianas (Ortlepp *et al.*, 2001), hiperparatiroidismo (Segersten *et al.*, 2002) e patologias comuns do metabolismo ósseo (Langdahl *et al.*, 2000), em particular osteoporose (Morrison *et al.*, 1992; Gross *et al.*, 1996). A osteopenia e a osteoporose são caracterizadas pela redução de massa óssea e ambas têm sido associadas à periodontite por possuírem mecanismos patológicos comuns que envolvem uma quebra da homeostasia óssea (Geurs *et al.*, 2003). O polimorfismo no éxon 9 (*TaqI*) do gene do VDR tem sido estudado (Hennig *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002; Uygur *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2003; Tachi *et al.*, 2003; Brito Jr *et al.*, 2004; Brett *et al.*, 2005) e todos o apontaram como possíveis indicadores de risco para a periodontite crônica (Sun *et al.*, 2002; Uygur *et al.*, 2002; Tachi *et al.*, 2003; Inagaki *et al.*, 2003;

Brito Jr *et al.*, 2004; Brett *et al.*, 2005) ou periodontite agressiva (Hennig *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002; Brett *et al.*, 2005).

Esses estudos sugerem uma possível associação entre o gene do VDR e a suscetibilidade à periodontite crônica. Porém, mais estudos são necessários para que esta relação seja melhor esclarecida.

2. PROPOSIÇÃO

1- Investigar a associação entre os parâmetros microbiológicos, clínicos e genéticos.

2- Comparar a presença de polimorfismo (*TaqI*) no gene do receptor da vitamina D (VDR) em indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica.

3- Analisar a composição da microbiota subgengival em indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção da amostra

Foram triados 250 pacientes que procuraram tratamento na Clínica de Odontologia da Universidade Guarulhos (SP) e 60 indivíduos foram selecionados para a participação no estudo, constituindo-se dois grupos: Periodontite (n=30, indivíduos portadores de periodontite crônica) e Saudáveis (n=30, indivíduos periodontalmente saudáveis). A seleção foi realizada por três mestrandos em periodontia, sob supervisão dos professores da disciplina. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e coletas. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, contendo as informações a respeito da pesquisa, objetivos, riscos e conseqüências (Anexo A), responderam a um questionário de saúde/anamnese (anexo B), foram submetidos a exame periodontal completo (anexo C) e receberam terapia periodontal gratuita, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº196/96). O projeto foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Guarulhos.

3.2. Critérios de inclusão

Para a inclusão no estudo, a seleção dos participantes respeitou os seguintes critérios:

Grupo Periodontite:

- Ter idade igual ou superior a 30 anos;
- Possuir no mínimo 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Apresentar pelo menos 6 dentes com 1 sítio interproximal com profundidade à sondagem e nível clínico de inserção ≥ 5 mm, não contíguos, distribuídos em quadrantes distintos.

Grupo Saudável:

- Ter idade igual ou superior a 30 anos;
- Possuir no mínimo 20 dentes, excluindo-se os terceiros molares;

- Não apresentar sítios com profundidade à sondagem e nível clínico de inserção \geq a 4 mm, sendo aceitável no máximo 2 sítios por indivíduo com nível clínico de inserção igual a 5 mm, apenas em caso de retração e sem evidências clínicas de gengivite generalizada.

3.3. Critérios de exclusão

- Fumantes;
- Gravidez ou lactação;
- História de tratamento periodontal anterior;
- Antibioticoterapia e/ou uso de medicamentos sistêmicos e anti-sépticos bucais nos últimos seis meses;
- Doença sistêmica que comprometa a resposta do hospedeiro ou exija medicação profilática ao tratamento.

3.4. Avaliação clínica

3.4.1. Calibração dos examinadores

Três examinadores foram treinados e calibrados com o objetivo de conseguir a máxima reprodutibilidade nas medições realizadas por cada um deles e entre eles. A metodologia utilizada para a calibração foi preconizada por Araujo *et al.* (2003), que avaliaram o erro padrão da medida (e.p.m.) e o erro médio percentual (e.m.p.) para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (profundidade à sondagem e nível clínico de inserção). Para as variáveis categóricas (índice de placa visível e índice de sangramento gengival), considerando a presença ou ausência do parâmetro clínico, foi realizada a média do nível de concordância para cada examinador e entre eles. Todos os examinadores apresentaram uma concordância intra- e inter-examinador superior a 92% (teste Kappa).

3.4.2. Parâmetros clínicos

As avaliações clínicas foram realizadas por três examinadores calibrados utilizando sondas periodontais milimetradas tipo PCPUNC-BR 15 (HuFriedy do

Brasil, RJ, RJ, Brasil). Todos os dentes, exceto os terceiros molares, foram avaliados em 6 sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), para os seguintes parâmetros:

- *Índice de Placa Visível* – (Ainamo e Bay, 1975): ausência (escore 0) ou presença (escore 1) de placa dentária supragengival visível, após lavagem e secagem dos dentes.
- *Índice de Sangramento Gengival* – (Ainamo e Bay, 1975): ausência (escore 0) ou presença (escore 1) de sangramento na gengiva marginal após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival.
- *Profundidade à Sondagem* – Distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.
- *Nível Clínico de Inserção* – Distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.
- *Sangramento à Sondagem* – Presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento até 20 segundos após a sondagem com sonda periodontal milimetrada.
- *Supuração* – Presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de supuração até 20 segundos após a sondagem com sonda periodontal milimetrada.

3.5. Avaliação microbiológica

3.5.1. Seleção dos sítios-teste

Grupo Periodontite: Amostras de biofilme subgengival foram coletadas de 6 sítios por indivíduo, localizados em dentes com faces interproximais não-contíguas, com profundidade à sondagem e nível clínico de inserção ≥ 5 mm, preferencialmente distribuídos entre os diferentes quadrantes. Foram excluídos os sítios com restauração em excesso e áreas de bifurcação.

Grupo Saudável: Amostras de biofilme subgengival foram coletadas de 6 sítios mésio-vestibulares selecionados ao acaso, por meio de sorteio de um dente por cada sextante.

3.5.2. Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 38 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela 1. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) ou do *Forsyth Institute* (Boston, MA, USA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10%H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado e 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado, 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma). *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose, 400µg/ml de niaciamida, 150µg/ml espermina tetraidroclorídrica, 20µg/ml de isobutirato de Na, 1mg/ml de L-cisteína, 5µg/ml de tiamina pirofosfato e 0,5% de soro bovino.

3.5.3. Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram anaerobicamente cultivadas na superfície de ágar-sangue contido em placas de Petri, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo de cultura, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos de microcentrífuga de 1,5ml contendo 1ml de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células das cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C₁₂H₂₅NaO₄S) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). As cepas Gram-positivas foram lisadas em 150µl de uma mistura enzimática contendo 15mg/ml de lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão de TE (pH 8,0). O DNA foi isolado

e purificado como descrito por Smith *et al.* (1989). As sondas multi-genômicas (*whole-genomic*) foram preparadas para cada uma das 38 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As espécies bacterianas avaliadas foram selecionadas segundo sua associação com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Haffajee & Socransky, 1994).

Tabela 1. Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA separadas por complexos bacterianos (Socransky *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2002).

Espécies	Cepas	Espécies	Cepas
Complexo Azul		Complexo Laranja (cont.)	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss. <i>nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>vincentii</i>	49256 ^a
Complexo Roxo		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>Micromonas micros</i>	33270 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
Complexo Amarelo		<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	Complexo Vermelho	
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
Complexo Verde		Outras Espécies	
<i>Actinobacillus</i>	43718 ^a	<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>actinomycetemcomitans</i> a e b	29523 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Propionibacterium acnes</i> I e II	11827 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	51146 ^a		11828 ^a
Complexo Laranja		<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a	<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b
<i>Campylobacter showae</i>	33612 ^a		
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a		

^a ATCC (American Type Culture Collection)

^b Forsyth Institute.

3.5.4. Coleta de amostras de biofilme subgengival

A coleta de amostras de biofilme subgengival foi realizada com curetas Gracey do tipo mini-five (HuFriedy), posicionadas na porção mais apical dos 6 sítios previamente selecionados para o exame microbiológico. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150µl de solução TE (pH 7,6), ao qual foram adicionados 100µl de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo. Estes tubos foram então identificados e armazenados até serem analisados por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para as 38 cepas bacterianas descritas na Tabela 1, no laboratório de microbiologia da Universidade Guarulhos.

3.5.5. Checkerboard DNA-DNA Hybridization

Hibridização DNA-DNA

As suspensões contidas nos tubos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão de placa bacteriana contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* (Immunelectrics, Cambridge, MA, USA- Figura 1) ficando, assim, concentrada em uma membrana de *nylon* (15 x 15cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim). As duas últimas canaletas do *Minislot* (Immunelectrics) foram ocupadas por controles contendo uma mistura do DNA das espécies de microrganismos investigadas pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1ng e 10ng de DNA de cada espécie, respectivamente (Socransky *et al.*, 1994; Haffajee *et al.*, 1997a, b). A membrana foi então removida do *Minislot* (Immunelectrics) e o DNA nela concentrado foi fixado por meio de aquecimento em forno a 120° C por 20 minutos.

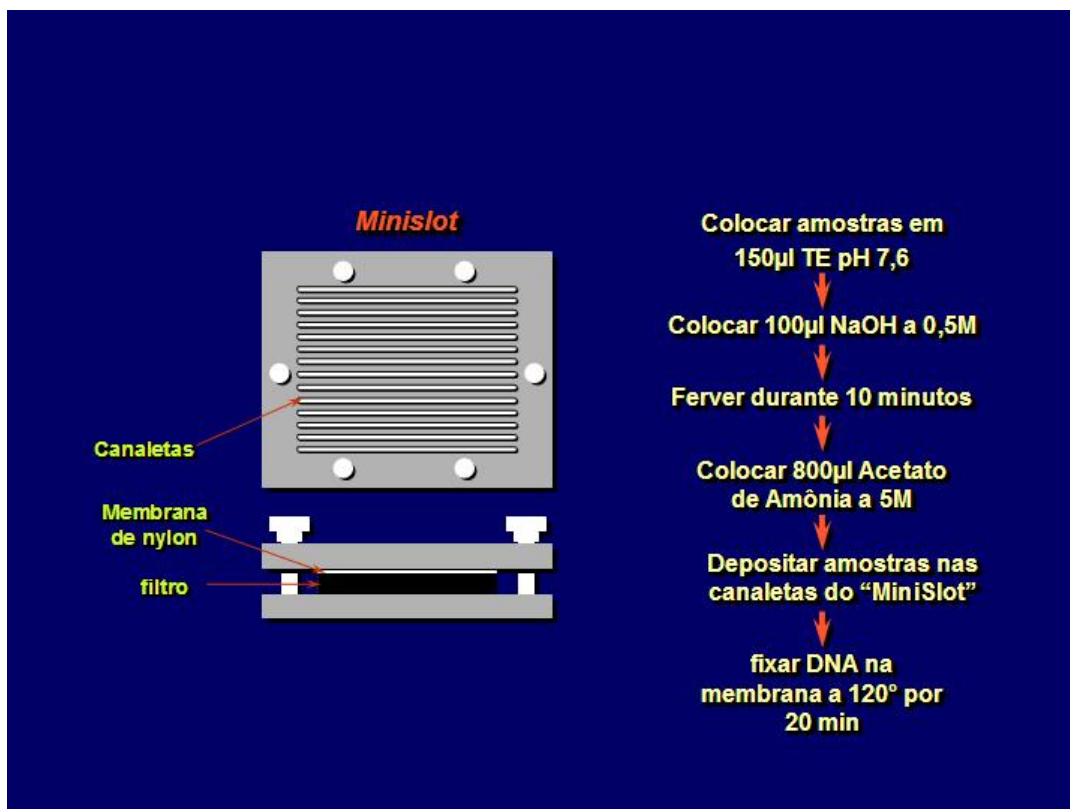


Figura 1. Representação gráfica do *Minislot* (Immunelect, Cambridge, MA, USA) e resumo da preparação e deposição das amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

A membrana foi pré-hibridizada a 42° C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5 x *standard saline citrate* - SSC (1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim).

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* (Immunelect, Figura 2) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* (Immunelect) foi adicionada uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130 µl de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período mínimo de 20 horas, a 42° C.

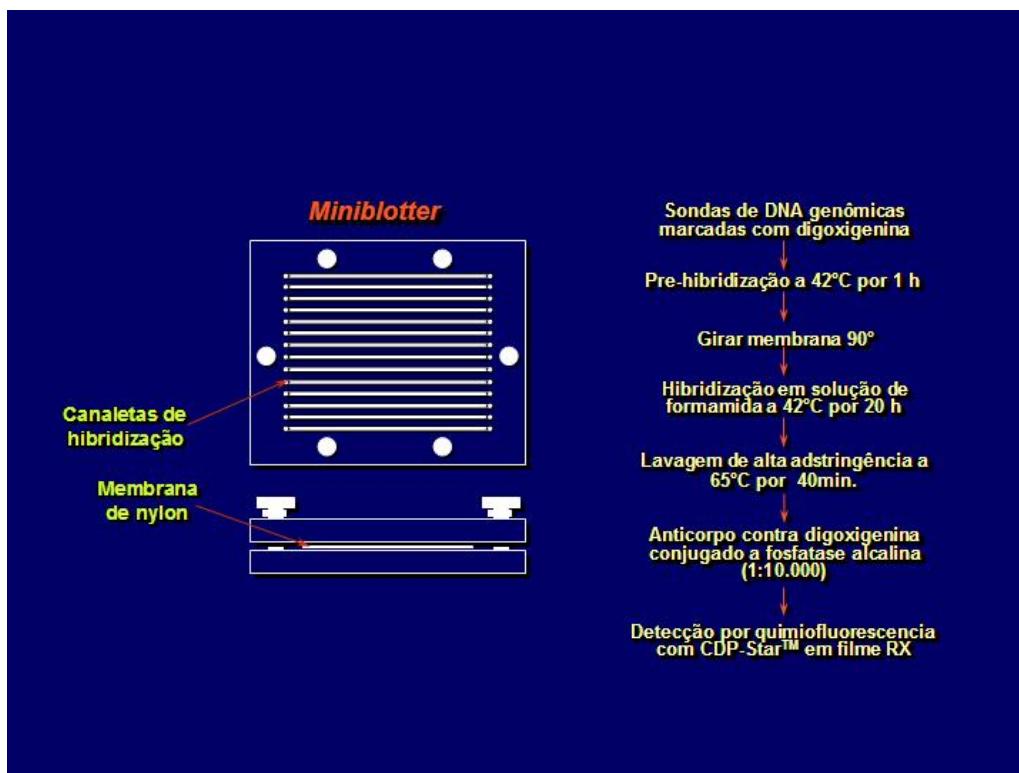


Figura 2. Representação gráfica do *Miniblotter* (Immunelect, Cambridge, MA, USA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

Deteção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* (Immunelect) lavada por 40 minutos, a 65°C numa solução adstringente composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C₄H₄O₄), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi depois lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, 50 mM de MgCl₂, pH 9,5.

Os próximos passos foram a incubação da membrana por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection

Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England, UK). A seguir, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30x40cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca Kodak X-Omat K, 18x24cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado (Figuras 3 e 4) manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, sempre mantidas à temperatura de 20°C.

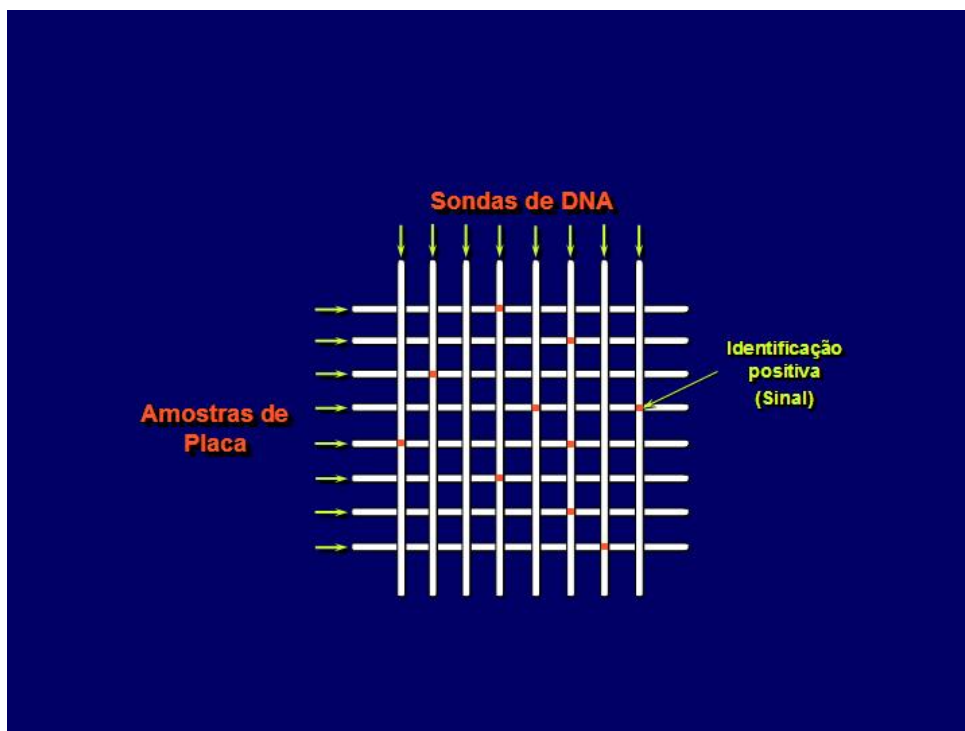


Figura 3. Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

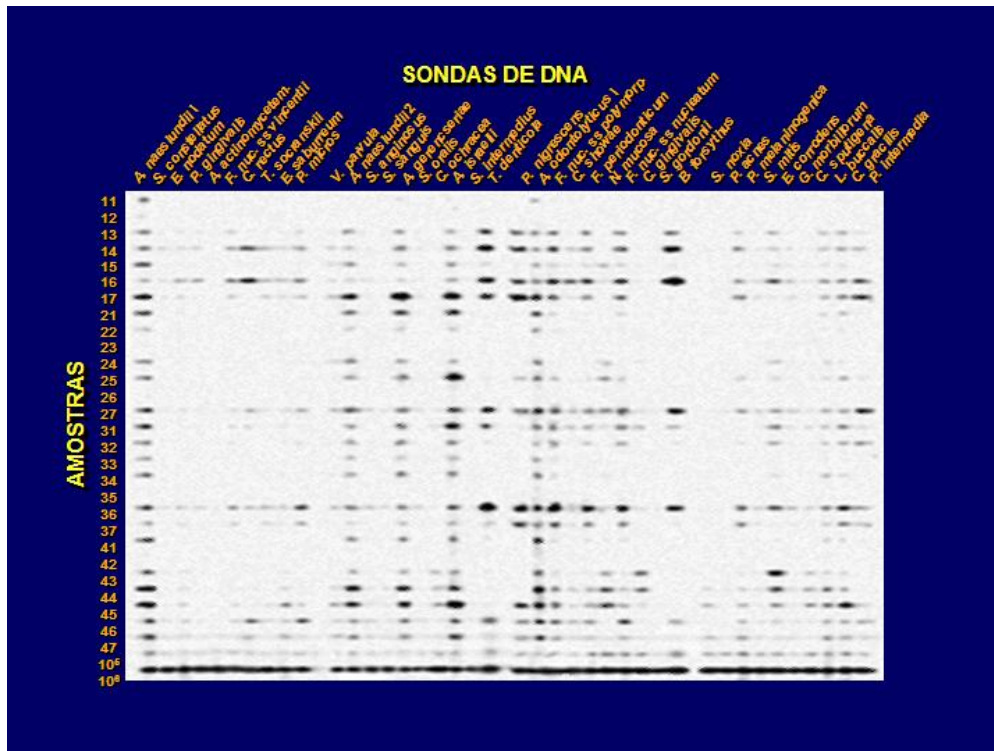


Figura 4. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*). Nesta figura estão apresentadas 40 bactérias, e as amostras de biofilme são de todos os dentes de um mesmo indivíduo.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de 10^5 células; 2 equivaleu a aproximadamente 10^5 células; 3, entre 10^5 e 10^6 células; 4 aproximadamente 10^6 células e 5, mais de 10^6 células (Tabela 2). Estes registros foram então utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nos sítios e indivíduos do estudo.

Tabela 2. Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival.

ÍNDICE	NÍVEL DO MICRORGANISMO	CONTAGEM
0	Não detectado	0
1	Menos de 10^5 células	10.000
2	Aproximadamente 10^5 células	100.000
3	Entre 10^5 e 10^6 células	500.000
4	Aproximadamente 10^6 células	1.000.000
5	Mais de 10^6 células	10.000.000

3.6. Avaliação genética

3.6.1. Análise de polimorfismo genético

Obtenção do material

O DNA foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, por meio de um bochecho com solução de glicose a 3%, por 1 min., e raspagem da mucosa jugal com espátula de madeira esterilizada que foi mergulhada e agitada na solução pré-bochada (Trevilatto & Line, 2000). Esta solução foi centrifugada por 10 min. a 2000 rpm, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 500 μ L de tampão de extração [10mM Tris-HCl (ph 7,8), 5 mM EDTA, 0,5% SDS].

Extração do DNA

As amostras foram incubadas *overnight* (ON) com 100ng/mL de proteinase K (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 37°C sob agitação. O DNA foi purificado utilizando-se a extração pela seqüência fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico e precipitação com sal/etanol. O DNA foi ressuspendido em 70 μ L de tampão TE [10mM Tris (ph 7,8), 1mM EDTA]. A concentração do DNA foi estimada

em espectrofotômetro (GeneQuant RNA/DNA Calculator – *Pharmacia-Biotec*) em comprimentos de onda de 260 nm.

PCR-RFLP - Receptor da vitamina D (VDR)

Polimorfismo no gene do VDR (*TaqI*). Códon 352 no éxon 9 (T→C)

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizadas as seguintes seqüências de *primers*:

Primer 1: 5'- CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG - 3' (*forward*)

Primer 2: 5'- GGATGTACGTCTGCAGTGTG - 3' (*reverse*) (1 µM) (Henning *et al.*, 1999)

A PCR foi realizada com um volume total de 50 µL, contendo aproximadamente 500 ng de DNA genômico, 1 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs e 2 unidades de *Taq* polymerase. As soluções foram incubadas a 95 °C por 3 minutos e submetidas a 35 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 1 min. a 63 °C e 1,15 min. a 72 °C e uma extensão final de 72 °C por 7 min. O fragmento amplificado apresentava 340 pb. As seqüências gênicas foram amplificadas em termociclador convencional (*Mastercycler® personal – Eppendorf – Figura 5*).

Digestão com enzima de restrição (Técnica de Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP)

Doze microlitros do produto da PCR foram adicionados a 13 µL de solução contendo 2,5 µL 10x NE Buffer (50 mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, pH 7,9), 0,4 µL *TaqI* (10,000 U/mL – New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EUA) e 10,1 µL de H₂O deionizada esterilizada. A solução foi incubada a 65 °C *overnight*.

O RFLP foi criado pela transição de uma única base (T→C) no códon 352 do éxon 9 do gene do VDR quando este foi exposto à enzima de restrição *TaqI*. Os alelos foram designados “t” (presença do sítio para *TaqI*, formando um fragmento com 260 pb e outro com 80 pb), e “T” (polimorfismo- ausência de sítio para *TaqI*, mantendo o fragmento de 340 pb) (HENNING *et al.*, 1999 modificado).

Os possíveis genótipos são: “TT”, “Tt”, “tt”, onde “t” significa a presença do sítio de restrição e “T” a ausência do sítio.



Figura 5- Termociclador.

Eletroforese

O volume total da digestão foi misturado a 3 μ L de tampão de amostra e submetido a eletroforese (Figura 6) em gel de poliacrilamida a 10% (não-desnaturante) sob corrente elétrica de 20 mA. Para análise, o gel (Figura 7) foi corado pela prata (DNA Silver Staining Kit, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia) (Blum, 1987).



Figura 6- Eletroforese

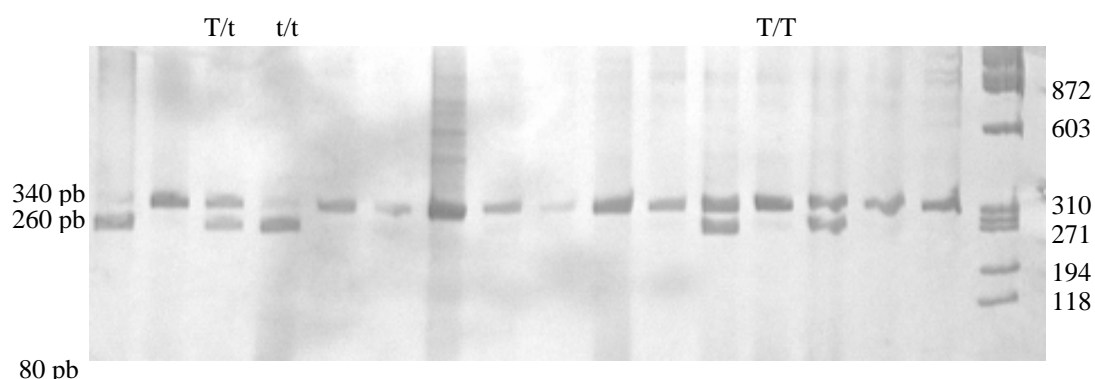


Figura 7- Gel de poliácridamida, corado por prata, evidenciando resultado da RFLP do gene do receptor da vitamina D (VDR-*TaqI*). Indivíduo homocigoto para o alelo t (t/t), indivíduo homocigoto para o alelo T (T/T), indivíduo heterocigoto (T/t) e padrão de massa molecular (P).

3.7. Análise estatística

3.7.1. Dados microbiológicos

Os dados microbiológicos foram expressos em nível médio de cada espécie (contagem) em cada sítio. Estes níveis foram computados por indivíduo. A significância estatística foi estabelecida em 5% (Teste U de Mann-Whitney). Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas, como proposto por Socransky *et al.* (1991). Foi aplicada a fórmula $0,05 = 1 - (1-k)^{38}$, onde k é o valor equivalente ao $p < 0,05$ quando ajustado para a comparação de 38 bactérias. Desta forma, as diferenças detectadas no presente estudo foram consideradas significativas quando $p \leq 0,002$.

3.7.2. Dados genéticos

Para a análise do polimorfismo no gene da VDR, a distribuição do genótipo e a frequência alélica nos indivíduos do grupo Saudável e com Periodontite foram comparadas por meio do teste de χ^2 (Qui-quadrado). O risco à doença, associado com alelos ou genótipos, foi calculado utilizando “odds ratio” (OR) com um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

4.1. Perfil epidemiológico e clínico dos participantes do estudo

A Tabela 3 apresenta os dados epidemiológicos e os valores médios dos parâmetros clínicos dos indivíduos dos dois grupos experimentais. Os grupos foram homogêneos em relação à idade e ao gênero. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos para todas as variáveis clínicas. O grupo de indivíduos com periodontite crônica apresentou uma maior média de profundidade à sondagem e nível clínico de inserção, e no percentual de sítios com sangramento gengival, sangramento à sondagem, placa visível e supuração.

Tabela 3: Média (\pm dp) dos parâmetros clínicos nos grupos Saudável e Periodontite.

	Saudável	Periodontite Crônica
Idade (anos) ^{NS}	41,10 \pm 8,5(30-61)	42,03 \pm 6,2(30-54)
Gênero (m:f) ^{NS}	6:24	8:22
Profundidade à sondagem (mm)*	2,16 \pm 0,2	3,85 \pm 0,7
Nível clínico de inserção (mm)*	2,20 \pm 0,2	4,33 \pm 1,0
% sítios com:		
Placa Visível*	43,74 \pm 17,8	84,73 \pm 10,7
Sangramento Gengival*	6,52 \pm 5,5	40,72 \pm 22,4
Sangramento à Sondagem*	27,73 \pm 20,5	63,63 \pm 20,2
Supuração*	0,0	3,09 \pm 3,7

dp: desvio padrão; NS: não-significante; * Teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$);

m= masculino; f= feminino.

4.2. Resultados microbiológicos

A Figura 8 mostra que o grupo de indivíduos periodontalmente saudáveis apresenta uma menor quantidade total de microrganismos ($0,3 \times 10^7 \pm 0,7$) em relação aos indivíduos com periodontite crônica ($4,5 \times 10^7 \pm 2,9$). A média de contagem ($\times 10^6 \pm$ desvio padrão) das 38 espécies subgengivais avaliadas nos

grupos Saudável e Periodontite estão apresentados na Figura 9. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Socransky *et al.* (1998) e Socransky & Haffajee (2002). Os níveis médios de cada espécie foram computados para cada indivíduo e depois dentro do grupo. Todas as espécies foram detectadas em ambos os grupos. Os níveis médios das 38 espécies avaliadas estavam estatisticamente menores no grupo de indivíduos saudáveis, principalmente as bactérias do complexo vermelho e laranja. Os níveis médios ($\times 10^6$) de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* foram de $4,0 \pm 3,2$, $2,5 \pm 2,2$ e $5,4 \pm 2,8$, respectivamente, no grupo de periodontite; e de $0,3 \pm 1,1$, $0,07 \pm 0,3$ e $0,4 \pm 0,8$ no grupo de indivíduos saudáveis. Espécies consideradas benéficas, como *A. odontolyticus* e *V. parvula* que compõem o complexo roxo, espécies de *Streptococcus* do grupo amarelo e espécies de *Capnocytophaga*, do complexo verde, também estavam em níveis extremamente baixos nos indivíduos do grupo saudável.

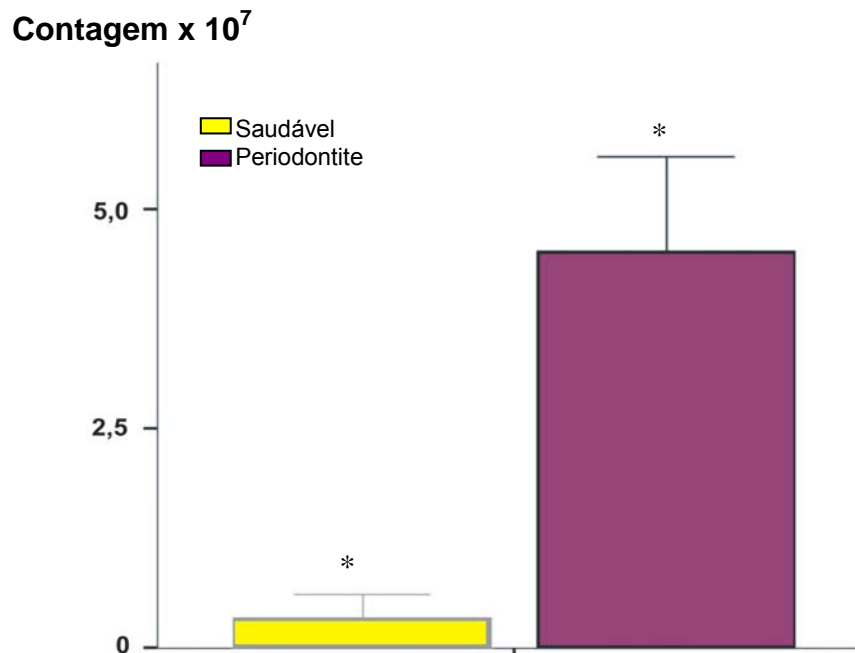


Figura 8: Média da contagem total ($\times 10^7 \pm dp$) das espécies bacterianas analisadas por meio do teste diagnóstico *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*.

* Teste U de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

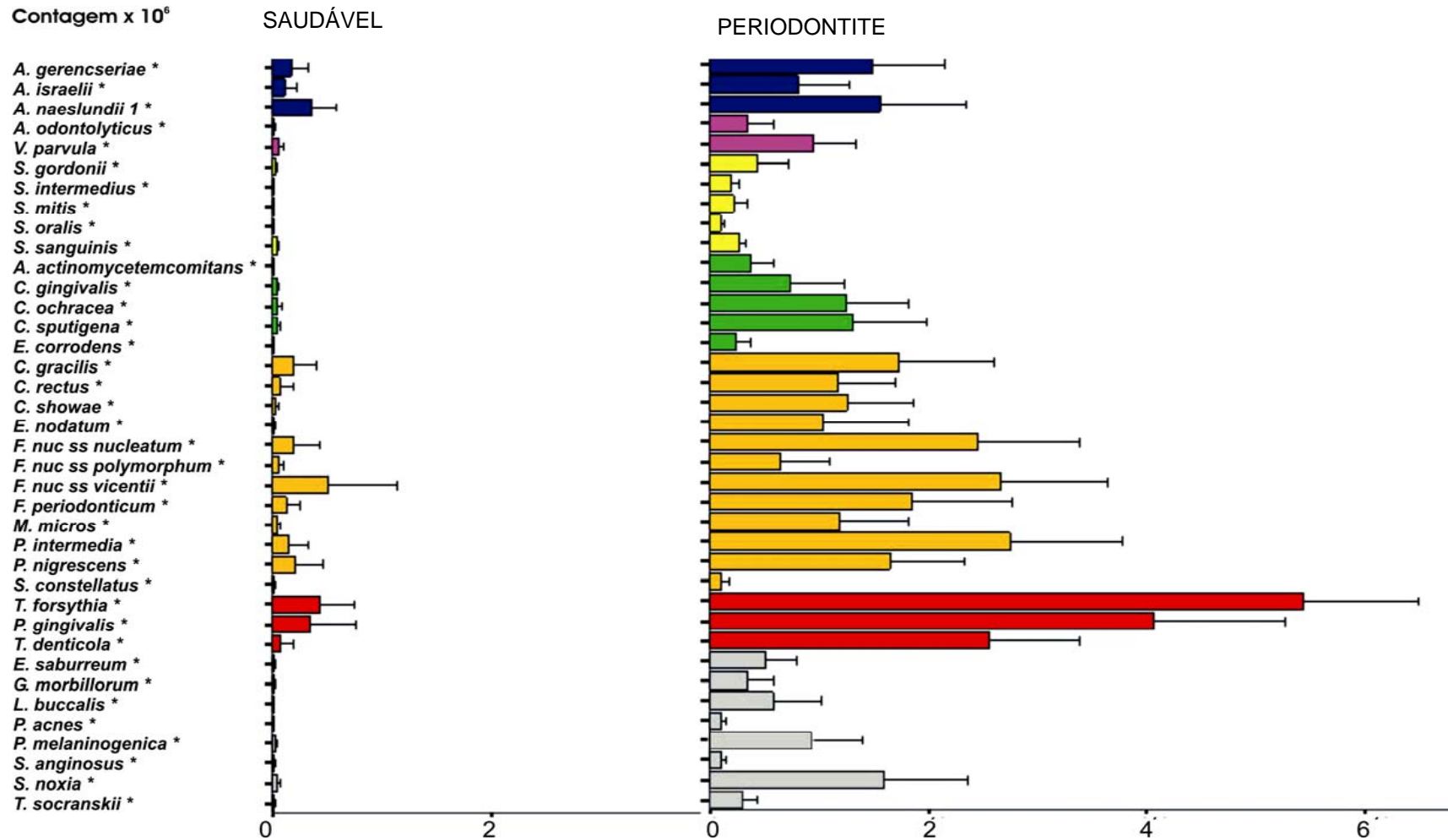


Figura 9: Gráfico de barras das médias de contagem (x 10⁶ ± dp) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos indivíduos dos grupos Saudável e Periodontite. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Socransky *et al.*, 1998 e Socransky & Haffajee, 2002. * Teste U de Mann-Whitney, p ≤ 0,05. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: azul roxo amarelo verde laranja vermelho outros

A média do percentual de sítios colonizados pelas espécies avaliadas nos dois grupos experimentais está representada na Figura 10. Os indivíduos com periodontite crônica mostraram um percentual alto de sítios colonizados (mais de 75%) por todas as espécies avaliadas. Já nos indivíduos periodontalmente saudáveis essas prevalências foram significativamente inferiores para todas as espécies avaliadas. Os microrganismos mais prevalentes no grupo Saudável, presentes em mais de 25% dos sítios, foram 4 espécies do complexo laranja (*F. nuc. ss. nuclatum*, *F. nuc. ss. polymorphum*, *F. nuc. ss. vincentii* e *F. periodonticum*), e 12 espécies consideradas benéficas, como *S. gordonii*, *S. intermedius* e *S. sanguinis* do complexo amarelo; *E. corrodens*, *C. sputigena* e *C. gingivalis* do complexo verde; *V. parvula* e *A. odontolyticus* do grupo roxo; *A. gerencseriae*, *A. israelii* e *A. naeslundii 1* do complexo azul; além de *S. anginosus*. A maioria das espécies do complexo laranja, os 3 patógenos do complexo vermelho e outros patógenos como *T. socranskii* e *P. acnes* foram encontradas em baixa prevalência nesses indivíduos.

A média das proporções dos diferentes complexos microbianos descritos por Socransky *et al.* (1998) e Socransky & Haffajee (2002) estão demonstradas na Figura 11. As proporções das espécies pertencentes a cada complexo foram somadas e a média da proporção de cada um foi determinada. Houve diferenças profundas entre os dois grupos, sendo que os complexos laranja, amarelo, azul, vermelho e outros diferiram significativamente entre saudáveis e periodontalmente comprometidos. O complexo vermelho somou 30,2% das espécies avaliadas nos indivíduos com periodontite crônica, e 4,8% nos saudáveis. Por outro lado, as espécies benéficas de *Actinomyces* somaram 45,4% da microbiota nos saudáveis e apenas 10,7% dos doentes. Somando-se os complexos que abrigam a maioria dos patógenos (vermelho e laranja); e aqueles que abrigam as espécies compatíveis com o hospedeiro (amarelo, roxo, verde e azul) houve uma grande divergência entre os grupos. Nos indivíduos com periodontite os patógenos somaram 64,2% e os benéficos 25,7% da microbiota avaliada, enquanto que nos indivíduos saudáveis essas proporções foram de 27,1% e 70,2%, respectivamente.

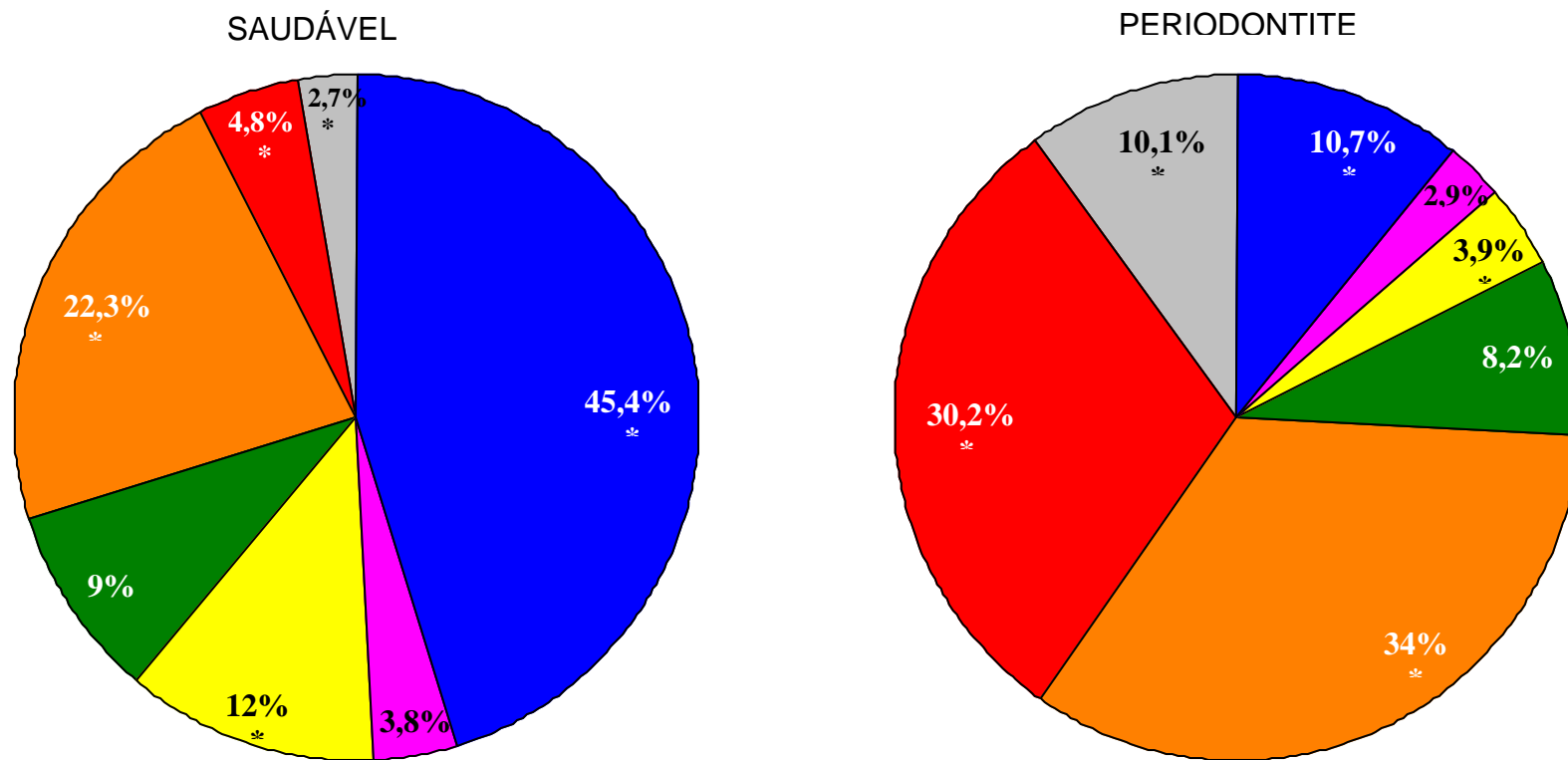


Figura 11: Gráfico setorial da média das proporções dos complexos microbianos descritos por Socransky *et al.*, 1998 e Socransky & Haffajee, 2002, presente nas amostras de biofilme subgengival presente nos indivíduos dos grupos Saudável e Periodontite

*Teste U de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: azul roxo amarelo verde laranja vermelho outros

4.3. Resultados genéticos

As frequências dos alelos e genótipos do VDR-*TaqI* podem ser observadas na tabela 4. A distribuição genotípica dos dois grupos estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$).

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica, analisando os diferentes genótipos. Observou-se que o genótipo heterozigoto (Tt) foi mais prevalente no grupo com periodontite crônica (60%) do que no grupo de indivíduos saudáveis (30%). Por outro lado, o genótipo “TT” foi mais prevalente nos saudáveis (53,3%) do que nos doentes (23,3%). Já o genótipo “tt” foi observado em prevalências iguais nos dois grupos (16,7%). O cálculo do Risco Relativo (*odds ratio* -OR) revelou que indivíduos com genótipos “Tt” estão 4,57 mais suscetíveis a apresentar periodontite crônica do que os indivíduos que apresentam o genótipo “TT” (OR=4,57; 95% CI=1,4 -15,1).

Foi avaliada também a distribuição dos dois alelos, “T” e “t” entre os indivíduos do estudo para ver se existia alguma associação entre eles e o estado periodontal de saúde ou doença. O alelo “T” foi detectado em 68,3% dos indivíduos saudáveis e em 53,3% dos com periodontite, e o alelo “t” em 31,7% e 46,7%, respectivamente. Essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

4.4. Associação entre o polimorfismo genético e a condição periodontal

A Figura 12 apresenta a média de contagem ($\times 10^6 \pm$ desvio padrão) das espécies avaliadas, nos grupos Saudável e Periodontite, de acordo com o genótipo dos indivíduos. Não houve diferença significativa nos níveis das espécies bacterianas avaliadas entre os três tipos de genótipo (TT, Tt ou tt), tanto no grupo Saudável, como no grupo Periodontite.

Tabela 4 - Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) *TaqI* do gene do VDR entre indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica.

<i>TaqI</i>	Genótipo			Qui-quadrado
	TT	Tt	tt	
Saudáveis (n=30)	16 (53,3%)	9 (30%)	5 (16,7%)	$X^2 = 6,522$ p = 0,038
Periodontite crônica (n=30)	7 (23,3%)	18 (60%)	5 (16,7%)	

	Alelo		Qui-quadrado
	T	t	
Saudáveis (n=60)	41 (68,3%)	19 (31,7%)	$X^2 = 1,748$ p = 0,258
Periodontite crônica (n=60)	32 (53,3%)	28 (46,7%)	

TT vs Tt

OR = 4,5714
p = 0,0232
IC 95% 1,3831 ≤ μ ≤ 15,1092

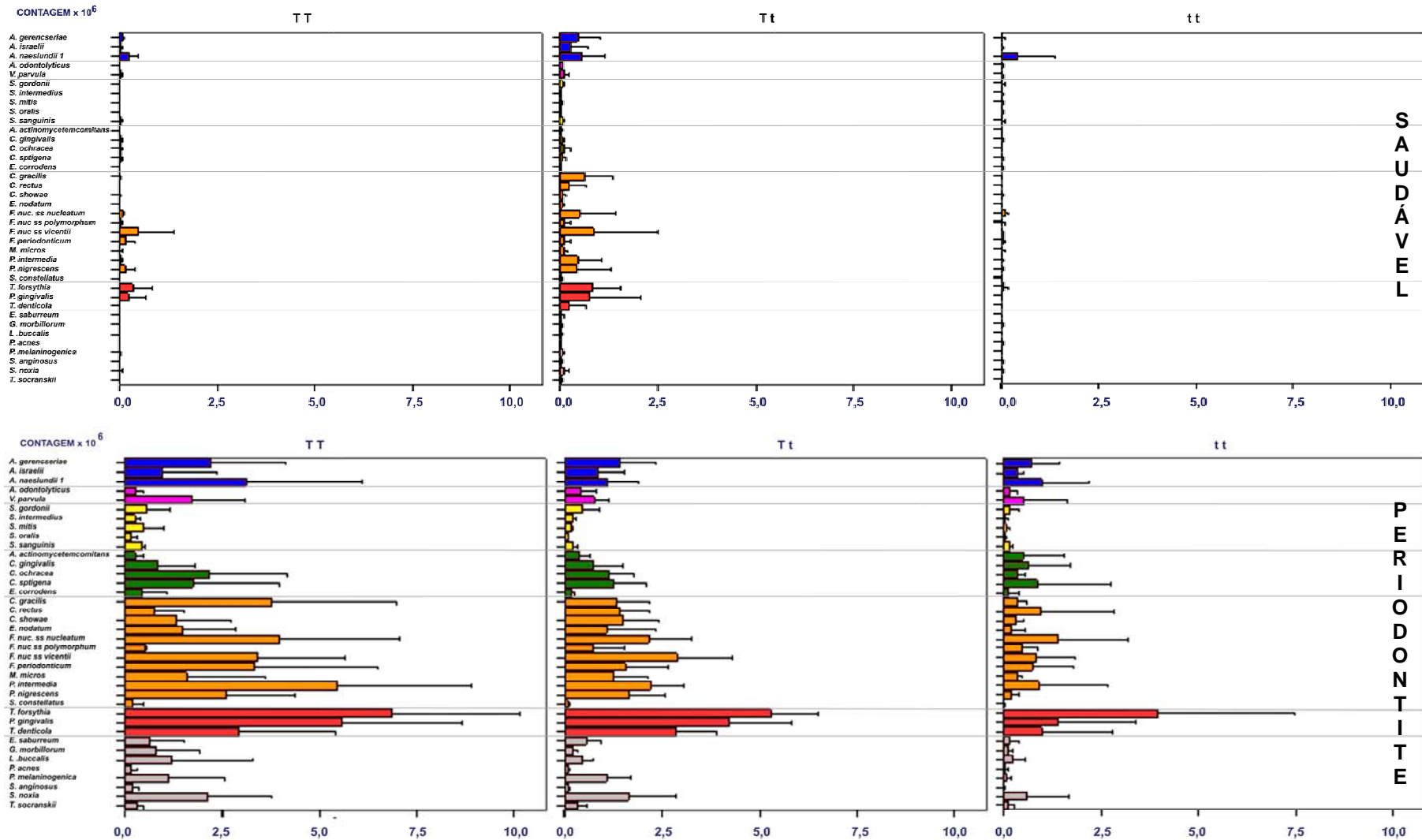


Figura 12: Gráfico de barras das médias de contagem ($\times 10^6$ + dp) de 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos indivíduos dos grupos Saudável e Periodontite, de acordo com o genótipo “TT”, “Tt” ou “tt”.

Teste U de Mann-Whitney, $p > 0,05$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

Complexos microbianos: azul ■ roxo ■ magenta ■ amarelo ■ verde ■ laranja ■ vermelho ■ outros ■ cinza

5. DISCUSSÃO

O caráter infeccioso da periodontite crônica já está bem estabelecido na literatura (Page, 1986; MacFarlane *et al.*, 1988; Socransky *et al.*, 1991; Socransky & Haffajee, 1994; Moore & Moore, 1994; Haffajee & Socransky, 1994; Zambon, 1996; Kornman *et al.*, 1997; Albandar *et al.*, 1997; Socransky *et al.*, 1998; Yano-Higuchi *et al.*, 2000; Klein & Gonçalves, 2003; Kumar *et al.*, 2003; Nishihara & Koseki, 2004; Mayanagi *et al.*, 2004; Socransky & Haffajee, 2005; Sakamoto *et al.*, 2005). Porém, os níveis e prevalências destes patógenos em indivíduos periodontalmente saudáveis ainda não estão totalmente definidos. É importante destacar que estudos recentes têm demonstrado que a composição da microbiota subgengival de indivíduos com doença periodontal (Haffajee *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2000) ou periodontalmente saudáveis (Haffajee *et al.*, 2005) podem variar substancialmente entre diferentes países. Adicionalmente, sabe-se que diversos fatores ou indicadores de risco, como o polimorfismo no gene do receptor da vitamina D (VDR) podem favorecer o desenvolvimento da doença periodontal e também deve-se considerar a possível variação entre as diversas populações (Hennig *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2003; Brito Jr. *et al.*, 2004; Tachi *et al.*, 2003).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi comparar a composição da microbiota subgengival e avaliar e comparar a presença de polimorfismo (*TaqI*) no gene do receptor da vitamina D (VDR) em indivíduos periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica.

Alguns estudos em populações periodontalmente saudáveis incluem indivíduos jovens (Tanner *et al.*, 1998; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000(a); Avila-Campos & Velásquez-Melendez, 2002; Mayanagi *et al.*, 2004; Haffajee *et al.*, 2005), o que pode levantar dúvidas sobre as possíveis diferenças observadas, uma vez que existe a possibilidade desses sujeitos desenvolverem periodontite quando alcançarem idade mais avançada. A inclusão de indivíduos dentro da mesma faixa etária (≥ 30 anos), realizada no presente estudo, minimiza este problema. Porém, torna-se necessário uma maior flexibilização dos critérios de inclusão para viabilizar a seleção da amostra. Como a probabilidade de indivíduos com mais de 30 anos de idade, mesmo os periodontalmente saudáveis, terem algum sítio com retração, foi aceito um nível de inserção de até 5 mm em no máximo 2 sítios por indivíduo.

Porém, a medição de profundidade à sondagem máxima para a inclusão foi de até 4 mm.

A análise dos parâmetros clínicos mostrou que os critérios de inclusão utilizados neste estudo foram satisfatórios no sentido de diferenciar de forma precisa os indivíduos com saúde ou doença periodontal, dentro de uma faixa etária semelhante ($41,10 \pm 8,5$ e $42,03 \pm 6,2$, respectivamente). O grupo Saudável mostrou todos os parâmetros clínicos compatíveis com saúde periodontal, e significativamente inferiores ao grupo Periodontite, incluindo profundidade à sondagem, nível clínico de inserção, sangramento à sondagem, sangramento gengival, índice de placa visível e supuração.

Aspectos Microbiológicos

A comparação entre os dois grupos mostrou uma quantidade total significativamente maior dos microrganismos avaliados nos indivíduos com periodontite crônica em comparação aos indivíduos periodontalmente saudáveis (Figura 8 e 9). Estes resultados eram esperados, uma vez que o grupo Periodontite apresentou uma maior média de profundidade à sondagem, e conseqüentemente uma maior área de superfície dental para acúmulo de biofilme e um ambiente mais favorável. As 3 espécies do complexo vermelho estavam reduzidas nos indivíduos saudáveis, em comparação com os doentes. *T. denticola* foi encontrado em níveis extremamente baixos nos indivíduos sem doença periodontal. Esses dados estão em concordância com outros estudos que avaliaram a composição da microbiota subgengival de indivíduos brasileiros (Carvalho *et al.*, 2005; Colombo *et al.*, 2002; Avila-Campos & Velásquez-Meléndez, 2002).

Haffajee *et al.* (1998) e Ximenez-Fyvie *et al.* (2000a), utilizando o *Checkerboard DNA-DNA hybridization* e as mesmas sondas de DNA do presente estudo, também observaram níveis bacterianos bem mais baixos em indivíduos americanos periodontalmente saudáveis quando comparados com pacientes com periodontite crônica ou em fase de manutenção periodontal. Em 1998, Tanner *et al.* utilizaram cultura e sondas de DNA e avaliaram a microbiota de indivíduos americanos sem evidência de doença periodontal e observaram contagens inferiores de *P. gingivalis* e *T. forsythia* às detectadas no presente estudo. Utilizando cultura microbiana, van Winkelhoff *et al.* (2002) observaram que *T. forsythia* e *P. gingivalis* foram encontrados em freqüência e com número de Unidades Formadoras de

Colônias bem inferiores em indivíduos holandeses saudáveis (47,9%, 44,2 UFC e 10,6%, 152,6 UFC, respectivamente) em comparação a indivíduos com periodontite de moderada a severa (90,5%, 409,9 UFC/ 59,5 % e 2365,7 UFC, respectivamente).

As proporções dos complexos microbianos no presente estudo (Figura 11) foram profundamente distintas entre os dois grupos, demonstrando que as diferenças entre a microbiota dos indivíduos saudáveis e com periodontite não são apenas quantitativas, ou seja, na quantidade total de microrganismos, mas também na composição do biofilme. A média de proporção do complexo vermelho foi de 4,8% nos saudáveis em comparação com 30,2% nos indivíduos com periodontite. Já o grupo azul, composto pelas espécies benéficas de *Actinomyces*, mostrou um padrão oposto, 45,4% nos saudáveis e 10,7% nos indivíduos com periodontite. Os grupos azul, amarelo, verde e roxo somaram um total de 70,2% nos saudáveis e 25,7% nos doentes, enquanto que a soma das proporções dos patógenos dos complexos vermelho e laranja foi de 27,1% e 64,2%, respectivamente. Haffajee *et al.* (2005) obtiveram dados semelhantes para indivíduos suecos e americanos periodontalmente saudáveis, sendo que esses autores detectaram uma menor proporção de espécies do complexo vermelho naquelas populações quando comparadas com o este estudo.

É importante destacar que todas as espécies bacterianas analisadas nas amostras de biofilme subgingival estavam presentes nos dois grupos, assim como em outros estudos que utilizaram as mesmas sondas de DNA aqui empregadas (Haffajee *et al.*, 1998; Haffajee *et al.*, 2004; Haffajee *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 1997, Carvalho *et al.*, 2005). No geral, o percentual de sítios colonizados pelas espécies bacterianas aqui avaliadas foi bem elevado nos indivíduos com periodontite. Já nos indivíduos saudáveis essas prevalências foram todas mais baixas e mais diversificadas (Figura 10). Os microrganismos encontrados em maior prevalência nos saudáveis foram aqueles relacionados à saúde periodontal, como diversas espécies de *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Capnocytophaga*, além de *V. parvula*. Por outro lado, os periodontopatógenos foram as espécies encontradas em menores prevalências. *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *M. micros*, *S. constellatus* e *T. socranskii* são exemplos de espécies detectadas em menos de 25% dos sítios avaliados. Algumas espécies de *Fusobacterium* estavam em prevalências altas nos saudáveis. Porém, é importante salientar que os microrganismos fusiformes são encontrados no biofilme subgingival

de praticamente todos os indivíduos. Apesar de fazerem parte do complexo laranja, são espécies consideradas extremamente comuns na cavidade oral (Socransky & Haffajee, 1994). Colombo *et al.* (2002) e Klein & Gonçalves (2003) também estudaram indivíduos brasileiros periodontalmente saudáveis. Colombo *et al.* (2002) encontraram que 41% dos sítios de indivíduos com periodontite e 25% dos periodontalmente saudáveis estavam colonizados por *A. actinomycetemcomitans*. No presente estudo essa espécie foi encontrada em 88% dos sítios dos indivíduos com periodontite e 7% dos sítios saudáveis. Os patógenos do complexo vermelho, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, estavam em prevalências semelhantes (12%; 18% e 9%, respectivamente) em comparação com o estudo de Colombo *et al.* (2002)(aproximadamente 17%, 12% e 5%, respectivamente). Essas diferenças podem ter ocorrido pelo fato dos indivíduos saudáveis do presente estudo terem apresentado uma média de idade maior, de 41 anos, em comparação com o estudo de Colombo *et al.* (2002), que foi de 34 anos. Klein & Gonçalves (2003) não detectaram a presença de *T. forsythia* em nenhum sítio saudável (sem inflamação ou perda de inserção) de indivíduos periodontalmente saudáveis em uma população brasileira. Por outro lado, essa espécie foi detectada de 70 a 100% dos sítios de indivíduos com periodontite moderada ou severa. *P. gingivalis* foi detectada em apenas uma amostra do grupo de saudáveis e de 40 a 90% dos sítios dos grupos de periodontite crônica moderada e severa, respectivamente.

Ximenez-Fyvie *et al.* (2000a) também relataram que a maior parte dos periodontopatógenos estava em prevalência baixa em indivíduos americanos com saúde periodontal. Porém, o percentual de sítios colonizados por algumas dessas espécies, incluindo as do complexo vermelho, foi ligeiramente menor do que o percentual observado no presente estudo. Utilizando PCR, Mayanagi *et al.* (2004) relataram uma frequência particularmente alta de *T. denticola* em indivíduos japoneses com saúde periodontal, por volta de 75%. Esses resultados divergem de todos os outros estudos acima descritos.

Diversos estudos na literatura demonstraram um aumento relativo na média de contagem, proporção ou prevalência de patógenos periodontais, principalmente os que compõem o complexo vermelho, nos indivíduos com periodontite em comparação com aqueles periodontalmente saudáveis (Dählen *et al.*, 1992, Moore & Moore, 1994; Riviere *et al.*, 1996; Ali *et al.*, 1997, Tanner *et al.*, 1996; Tanner *et al.*, 1998; Avila-Campos & Velásquez-Melendez, 2002; Haffajee *et*

al., 1998; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000a). Porém, assim como no caso da periodontite crônica (Haffajee *et al.*, 2004), parece existir diferenças na composição da microbiota de indivíduos periodontalmente saudáveis entre as diversas populações, como foi mostrado por Haffajee *et al.* (2005) entre suecos e americanos. Apesar de que poucos estudos deste tipo tenham sido realizados em população brasileira, os dados destes estudos e da presente investigação sugerem uma maior concentração de patógenos periodontais nos indivíduos saudáveis brasileiros do que nos de outros países (Colombo *et al.*, 2002; Avila-Campos & Velásquez-Melendez, 2002; Klein & Gonçalves, 2003). Este resultado pode ser devido à própria seleção dos indivíduos dos estudos, que normalmente apresentam um grau mais avançado de doença nos países em desenvolvimento. Isso provavelmente ocorre pelo fato destes indivíduos terem menos acesso ao tratamento odontológico, e na maioria das vezes, quando entram no estudo, não receberam nenhuma forma de terapia periodontal anterior.

Aspectos genéticos

Alguns estudos têm mostrado que polimorfismos em genes específicos podem influenciar a suscetibilidade à doença periodontal. Os primeiros estudos neste sentido mostraram uma associação entre polimorfismo no gene da IL-1, uma citocina inflamatória, e severidade de doença periodontal (Kornman *et al.*, 1997; McDevitt *et al.*, 2000) ou aumento no sangramento à sondagem (Lang *et al.*, 1999). Outros polimorfismos também têm sido estudados. Entre eles está o do receptor da vitamina D (*Vitamin D Receptor-VDR*), devido ao envolvimento desta vitamina com o metabolismo ósseo (Hennig *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002; Uygur *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2003; Tachi *et al.*, 2003; Brito Jr *et al.*, 2004; Brett *et al.*, 2005).

A letra utilizada para determinar os alelos provenientes da *TaqI* é a letra T e tem sido um consenso na literatura, que o alelo que apresentar letra maiúscula (“T”) indicará a ausência dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição (polimorfismo), e a minúscula (“t”) indicará sua presença (Hennig *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002; Uygur *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2003; Tachi *et al.*, 2003; de Brito Jr *et al.*, 2004; Brett *et al.*, 2005).

No presente estudo observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos genótipos “TT”, “Tt” e “tt” nos dois grupos, Saudável e Periodontite. O genótipo “TT” foi o mais prevalente nos indivíduos periodontalmente saudáveis, e o genótipo “Tt” nos indivíduos com periodontite

crônica. Já o genótipo “tt” foi encontrado em poucos indivíduos, somente 10 dos 60 indivíduos, sendo 5 saudáveis e 5 com periodontite. Resultados bem semelhantes foram obtidos por Brito Jr. *et al.* em 2004, também em uma população brasileira. Os autores analisaram haplótipos do gene do VDR (*BsmI* e *TaqI*) em 69 indivíduos com periodontite crônica e 44 periodontalmente saudáveis e encontraram associação com doença periodontal. Assim como no presente estudo, o genótipo “Tt” estava mais prevalente no grupo com periodontite crônica e o genótipo “TT” nos saudáveis. Indivíduos que apresentavam alguma forma de alelo “t” (genótipo “Tt” ou “tt”) foram 2,4 vezes mais suscetíveis em desenvolver periodontite crônica (*Odds Ratio*- OR = 2,4; 95% CI= 1,10 – 5,21). Vale ressaltar que o genótipo “tt” também foi encontrado em poucos indivíduos no estudo de Britto Jr. *et al.* (2004), 6 indivíduos saudáveis e 5 com periodontite crônica. Devido a baixa prevalência do genótipo “tt” e a sua falta de associação com doença ou saúde periodontal, no presente estudo foi feito o cálculo de OR comparando-se apenas os genótipos “TT” e “Tt”, e foi encontrada uma relação estatisticamente significativa, com um OR de 4,57 para os indivíduos com o genótipo “Tt” apresentarem doença periodontal crônica.

Esses dados estão de acordo com estudos realizados em outras populações (Hennig *et al.* 1999, Sun *et al.*, 2002, Inagaki *et al.*, 2003). Sun *et al.* (2002), avaliaram 24 indivíduos com periodontite crônica, 37 indivíduos chineses com periodontite agressiva e 30 periodontalmente saudáveis. O genótipo “tt” não foi encontrado em nenhum indivíduo. A frequência de detecção do genótipo “Tt” foi significativamente maior nos pacientes com periodontite agressiva (24,3%) do que nos pacientes com periodontite crônica (4,2%) ou saudáveis (5,1%). Os autores relataram que a frequência do alelo “t” também foi significativamente maior em indivíduos com periodontite agressiva.

Hennig *et al.* (1999) estudaram um grupo de 69 indivíduos com periodontite agressiva e 72 periodontalmente saudáveis, de herança caucasiana, e observaram que a presença do alelo “t” no gene do VDR aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de doença periodontal agressiva. A distribuição genotípica “TT”, “Tt” e “tt” para o grupo com periodontite agressiva foi de 7 (35%), 5 (25%) e 8 (40%), respectivamente; e para o grupo controle foi de 31 (43,1%), 36 (50%) e 5 (6,9%). Os autores mostraram uma associação significativa entre a prevalência do alelo “t” e o grupo com periodontite agressiva ($p= 0,017$). Indivíduos com o genótipo “tt” estariam aproximadamente 9 vezes mais suscetíveis a

desenvolver periodontite agressiva do que os indivíduos heterozigotos (Tt) ou homozigotos (TT).

O presente estudo não observou essa associação com o genótipo “tt” e periodontite, mas sim com o genótipo “Tt”. Porém, é importante ressaltar que o genótipo “tt” apresenta uma prevalência muito baixa. Um aumento no tamanho da amostra talvez pudesse ter revelado uma associação maior entre periodontite crônica e o genótipo “tt” ou o alelo “t”.

Resultados distintos foram obtidos por Tachi *et al.* (2003), em população japonesa e por Brett *et al.* (2005), em uma população de ingleses. Tachi *et al.* (2003) estudaram 168 indivíduos japoneses entre 35 e 65 anos e encontraram uma relação entre o polimorfismo no gene do VDR (genótipo “TT”) e periodontite. Os autores sugeriram que o genótipo “TT” e o alelo “T” levariam à um aumento na suscetibilidade à periodontite crônica. Brett *et al.* (2005), estudaram uma população britânica e também observaram que o genótipo “TT” esteve mais prevalente nos casos de doença periodontal crônica.

Uma possível explicação para essas diferenças pode ser o fato dos trabalhos terem sido realizados em diferentes grupos étnicos, pois o efeito genético pode variar de um grupo étnico para outro (Armitage *et al.*, 2000). Um exemplo deste fato foram os estudos sobre polimorfismos no gene da IL-1, que obtiveram resultados diferentes para japoneses (Armitage *et al.*, 2000) e caucasianos (Kornman *et al.*, 1997). Porém, uma vez que ainda existem na literatura divergências em relação à associação dos diferentes genótipos (TT, Tt e tt) relacionados ao polimorfismo do gene do VDR (*TaqI*) e periodontite, seria importante que outros estudos, envolvendo diferentes populações e com amostras maiores, fossem realizados.

Considerações finais

No presente estudo foram abordados 2 aspectos importantes da condição periodontal do indivíduo: a composição da microbiota do biofilme subgengival e o polimorfismo do gene do receptor da vitamina D, ambos em saúde e doença periodontal.

Os resultados do presente estudo mostraram que a composição da microbiota de indivíduos brasileiros periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica é completamente distinta. Foi encontrada uma forte associação entre certos

periodontopatógenos, como os do complexo vermelho e algumas espécies do complexo laranja, com o grupo Periodontite, enquanto que essas espécies estiveram em baixas proporções, níveis e prevalência nos indivíduos periodontalmente saudáveis. Por outro lado as espécies e complexos microbianos compatíveis com o hospedeiro, como espécies de *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Capnocytophaga*, estavam em níveis e proporções mais altos nos indivíduos periodontalmente saudáveis. Em relação ao polimorfismo do gene do VDR observou-se um maior risco de desenvolvimento de doença periodontal crônica em indivíduos que apresentaram o genótipo “Tt”, enquanto que o genótipo “TT” foi mais associado à saúde periodontal. A confirmação da influência deste e outros polimorfismos no risco à doença periodontal pode ter papel importante na prevenção e tratamento dessas doenças, nos sentido de um acompanhamento mais regular desses indivíduos ou na instituição de terapias antiinfeciosas mais específicas, direcionadas para aqueles de maior risco.

6. CONCLUSÕES

- Os perfis de colonização microbiana de indivíduos brasileiros periodontalmente saudáveis e com periodontite crônica são distintos.
- O grupo Saudável apresentou níveis e proporções mais altos de espécies e grupos de espécies compatíveis com saúde, e mais baixos de periodontopatógenos, principalmente os do complexo vermelho.
- O genótipo “Tt” mostrou uma maior associação com a doença periodontal, enquanto que o “TT” com a condição de saúde.
- Não houve diferença na composição da microbiota subgingival entre os genótipos do VDR (*TaqI*) avaliados, tanto no grupo Saudável quanto no grupo Periodontite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1997; 68: 973-81.

Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000; 71(12): 1874-81.

Ali RW, Johannessen AC, Dahlén G, Socransky SS, Skaug N. Comparison of the subgingival Microbiota of periodontally healthy and diseased adults in Northern Cameroon. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 830 -35.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25: 229-35.

Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol* 2003; 74: 1736-40.

Armitage GC, Wu Y, Wang, H, Sorrell J, di Giovine FS, Duff GW. Low prevalence of a periodontitis- associated Interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol* 2000; 71: 164-71.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11:266-273.

Avila-Campos MJ & Velasquez-Melendez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2002; 44: 1-5.

Baelum V, Fejerskov O, Manji F. Periodontal disease in adult Kenyans. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 445-52.

Barnett ML, Press KN, Friedman D, Sonnenberg EM. The prevalence of periodontitis and dental caries in a Down's syndrome population. *J Periodontol* 1986; 57: 288-93.

Boughman JÁ, Astemborski JÁ, Suzuki JB. Phenotypic assessment of early onset periodontitis in sibships. *J Clin Periodontol* 1992; 19:233-39.

*Baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Beaty TH, Boughman JA, Yang P, Astemborski JA, Suzuki JB. Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through affected proband. *Am J H Genetics* 1987; 40: 443-52.
- Blum H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987; 8: 93-99.
- Brett PM, Zygogianni GS, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, Tonetti M. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2005; 84: 1149-53.
- Brito Jr RB, Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Barros SP. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene are associated with periodontal disease. *J Periodontol* 2004; 75: 1090-95.
- Carvalho LH, D'Ávila GB, Leão A, Gonçalves C, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II – microbiological results. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 406-11.
- Cattabriga M, Rotundo R, Muzzi L, Nieri M, Verrocchi G, Cairo F, Pini Prato G. Retrospective evaluation of the influence of the interleukin-1 genotype on radiographic bone levels in treated periodontal patients over 10 years. *J Periodontol* 2001; 72: 767-73.
- Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol* 2000; 27:897-903.
- Choi BK, Park SH, Yoo YJ, Choi SH, Chai JK, Cho KS, Kim CK. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. *J Periodontol* 2000; 71:1387-1394.
- Colombo AP, Eftimiadi C, Haffajee AD, Cugini MA, Socransky SS. Serum IgG2 level, Gm(23) allotype and Fc γ RIIa and Fc γ RIIIb receptors in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 465-74.
- Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalem WJ, Mendes MC, Uzeda M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002, 73: 360-9.

- Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Rosalem W, Mendes MC, Souto RM, Uzeda M. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol* 2005; 76:778-784.
- Consensus Report for Periodontal Diseases (CRPD): Pathogenesis and microbiol factors. *Ann Periodontol* 1996; 1: 926-32.
- Craandijk J, van Krugtem MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG. Tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 28-34.
- Dahlen G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Putative periodontopathogens in diseased and non-diseased persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 35-42.
- Daniel C, Schlauch T, Zugel U, Steinmeyer A, Radeke H H,Steinhilber D, Stein.22-ene-oxa-vitamin D: a new vitamin D analogue with profound immunosuppressive capacities. *Eur J Clin Invest* 2005; 35:343-49.
- De Sanctis M, Zuchelli G. Interleukin-1 gene polymorphisms and long-term stability following guided tissue regeneration therapy. *J Periodontol* 2000; 71: 606-13.
- Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JÁ, Califano JV, Wang S, Schenkein HA. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1999; 70: 418-30.
- Di Murro C, Paolantonio M, Pedrazzoli V, Lopatin DE, Cattabriga M. Occurrence of Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and Treponema dentícola in periodontally healthy and diseased subjects as determined by an ELISA technique. *J Periodontol* 1997; 68:18-23.
- Engbretson SP, Lamster IB, Miriam H, Celenti RS, Timms JM, Chandhary AGA, di Giovine FS, Kornman KS. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of IL-1 β and tumor necrosis factor- α in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1999; 70: 567-73.
- Feinberg AP & Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132: 6-13.
- Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard KA, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival Microbiota. *J Clin Periodontol* 1999(a); 26:775-83.

Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard KA, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. *J Clin Periodontol* 1999 (b); 26:784-792.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol* 2001; 28:597-609.

Feres M, Cortelli SC, Figueiredo LC, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological basis for periodontal therapy. *J Appl Oral Sci* 2004; 12: 256-66.

Figueiredo LC, Toledo BEC, Salvador SL. The relationship between place BANA reactivity and clinical parameters in subjects with mental disabilities. *Spec Care Dentist* 2000; 20: 195-98.

Firatli E, Tüzün B, Efeoğlu A. Papillon-Lefèvre syndrome. Analysis of neutrophil chemotaxis. *J Periodontol* 1996; 67: 617-20.

Fu Y, Korostoff JM, Fine DH, Wilson ME. Fc γ receptor genes as risk markers for localized aggressive periodontitis in African-americans. *J Periodontol* 2002; 73: 517-23.

Gennari L, Becherini L, Masi L, Gonnelli S, Cepollaro C, Martini S *et al.*. Vitamin D receptor genotypes and intestinal calcium absorption in postmenopausal women. *Calcified Tissue International* 1997; 61(6): 460-463.

Geurs NC, Lewis CE, Jeffcoat MK. Osteoporosis and periodontal disease progression. *Periodontol* 2000 2003; 32: 105-110.

Gmur R, Thurnheer T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. *Microbiology* 2002; 148:1379-1387.

Gonçalves LS, Ferreira SMS, Silva Jr A, Villoria GE, Costinha LH, Colombo AP. Association of T CD4 lymphocyte levels and chronic periodontitis in HIV-infected brazilian patients undergoing highly active anti-retroviral therapy. Clinical results. *J Periodontol* 2005; 76: 906-13.

Greenstein G, Hart TC. A critical assessment of Interleukin-1 genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002; 73: 231-47.

- Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of Porphyromonas gingivalis and periodontal health status. J Clin Microbiol 1998; 36:3239-3242.
- Gross C, Eccleshall TR, Feldman D. Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology. San Diego: Academic Press; 1996. p. 917-33.
- Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. Ann Periodontol 1998; 3: 51-61.
- Grossi SS, Zambon JJ, Machtei EE, Schinfferle R, Andreana S, Genco RJ et al. Effects of smoking and smoking cessation on healing after mechanical therapy. JADA 1997; 128: 599-607.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 5: 78-111.
- Haffajee AD, Dibart S, Kent RL Jr, Socransky SS. Factors associated with different responses to periodontal therapy. J of Clin Periodontol 1995; 22:628-636.
- Haffajee AD, Socransky SS, Dibart S, Kent RL Jr. Response to periodontal therapy in patients with high or low levels of P. gingivalis, P. Intermedia, P. Nigrescens and B. Forsythus. J Clin Periodontol 1996; 23:336-345.
- Haffajee AD, Cugini MA, Dibart SS, Kent JR. RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. J Clin Periodontol 1997(a), 24: 324-34.
- Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. J Clin Periodontol 1997(b); 24: 767-76.
- Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent Jr RL et al. Subgingival Microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. J Clin Periodontol 1998; 25: 346-53.
- Haffajee AD, Socransky SS, Feres M, Ximenez-Fyvie LA. Plaque microbiology in health and disease. In: Dental Plaque Revisited Oral Biofilms in Health and Disease. Newman HN & Wilson M. 1st ed. Cardiff: Bioline 1999. p. 255-282.
- Haffajee AD & Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. J Clin Periodontol 2001; 28: 377-88.

- Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival Microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 2004; 996-1002.
- Haffajee AD, Japlit M, Bogren A, Kent Jr RL, Goodson JM, Socransky SS. Differences in the subgingival Microbiota of Swedish and USA subjects who were periodontally healthy or exhibited minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 33-39.
- Haffajee AD & Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000* 2005; 38: 9-12.
- Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, Worthington H, Palmer J, Bird P, Narayanan D, Davies R, Seymour G. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *J Dent Res* 2004; 83:232-235.
- Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol* 2003; 49:277-300.
- Hennig BJW, Parkhill JM, Chapple ILC, Heasman PA, Taylor JJ. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70: 1032-38.
- Holla LI, Fassmann A, Stejskalová A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004; 75: 30-36.
- Inagaki K, Krall EA, Fleet JC, Garcia R. Vitamin D receptor alleles, periodontal disease progression, tooth loss in the VA dental longitudinal study. *J Periodontol* 2003; 74: 161-67.
- Jeffcoat MK, Geurs NC, Lewis CE. Osteoporosis and periodontal bone loss. *Clin Calcium* 2003; 13(5): 577-81.
- Kamyia I, Okuda K, Hara K. Flow-cytometric identification and detection of *Porphyromonas gingivalis* by a LPS specific monoclonal antibody. *J Periodontol* 1994; 65: 309-15.
- Kato S. The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J Biochem* 2000; 127: 717-22.
- Klein MI, Gonçalves RB. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. *J Periodontol* 2003; 74: 798-802.

Kobayashi T, Yamamoto K, Sugita N, van de Pol WL, Yasuda K, Kaneko S *et al.* The Fc gamma receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol* 2001; 72: 1324-31.

Kornman KS, di Giovine F. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* 1998; 3: 327-38.

Kornman KS, Wang HY, di Giovine FS, *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 72-77.

Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Iida T, Shizukuishi S. Quantitative detection of periodontal pathogens using realtime polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:168-176.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003; 82(5): 338-44.

Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrel J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Dent Res* 2000; 35: 102-7.

Langdahl BL, Gravholt C H, Brixen K, Eriksen EF. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 608-17.

Levy RM, Giannobile WV, Feres M, Haffajee AD, Smith C, Socransky SS. The effect of apically repositioned flap surgery on clinical parameters and the composition of the subgingival microbiota: 12-month data. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22:209-219

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004; 97:1311-1318.

Löe H, Theilade E, Jensen B. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36: 177-87.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 431-40.

Loesche W. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev* 1976; 9: 65-107.

- Loesche W, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol* 1985; 56(8): 447-56.
- Long J, Nance W, Waring P, Burmeister J, Ranney R. Early onset periodontitis: a comparison and evaluation of two modes of inheritance. *Genet Epidemiol* 1987; 4: 13-24.
- Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 159-179.
- MacFarlane TW, Jenkins WMM, Gilmour WH, McCourtie J, McKenzie D. Longitudinal study of untreated periodontitis(II). Microbiological findings. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 331-37.
- Marazita ML, Burmeister JS, Gunsolley JC, Koertge Tem Lake, K, Schenkein, HÁ. Evidence for autosomal-dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1994; 65: 623-30.
- Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol Immun* 2004; 19: 379-85.
- McDevitt MJ, Wang H, Knobelman C, Newman MG, diGiovine FS, Timms J et al. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol* 2000; 71: 156-63.
- McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol* 1999; 70: 49-56.
- Meisel P, Schwahn C, Gesch D, Bernhardt O, John U, Kocher T. Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *J Periodontol* 2004; 75: 236-42.
- Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher Th. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1 α , IL-1 β , and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 2002; 73: 27-32.
- Meisel P, Siegemund A, Grimm R, Herrmann FH, John U, Schwahn C, Kocher T. The interleukin-1 polymorphism, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based SHIP study. *J Dent Res* 2003; 82: 189-93.

- Merchant AT, Pitiphat W, Ahmed B, Kawachi I, Joshipura K. A prospective study of social support, anger expression and risk of periodontitis in men. *JADA* 2003; 134: 1591-96.
- Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, Bouchard TJ Jr, Pihlstrom BL. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 1991; 62: 293-99.
- Michalowicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol*. 1994; 65: 479-88.
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE *et al.* Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 2000; 71:1699-1707.
- Moore WEC. Microbiology of periodontal disease. *J Periodont Res* 1997; 22: 335-41.
- Moore WEC, Moore LH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 42(3): 127-38.
- Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992; 89(15):6665-6669.
- Morrison N. Vitamin D gene receptor gene variants and osteoporosis: a contributor to the polygenic control of bone density. In: Feldman D, ed *Vitamin D*. San Diego: Academic Press; 1997: 713-31.
- Nares S. The genetic relationship to periodontal disease. *Periodontol* 2000 2003; 32: 36-49.
- Nielsen R. Population genetic analysis ascertained SNP data. *Hum Genomics* 2004; 1:218-24.
- Nishihara T & Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol* 2000 2004; 36: 14-26.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genética Médica*. 6. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2002.
- Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol* 2001; 28(6): 576-82.
- Page RC. Current understanding of the aetiology and progression of periodontal disease. *Int Dent J* 1986; 36: 153-61.

- Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 1991; 26: 230-42.
- Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 1997; 14: 9-11.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 2000; 14: 216-48.
- Palmer RM, Wilson RF, Hasan AF, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors- tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005; 32 (suplemento 6): 180-95.
- Peterlik M, Cross H S. Vitamin D and calcium predispose for multiple chronic diseases. *European. J Clin Investigation* 2005; 35: 290-304.
- Rams TE, Listgarten MA, Slots J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. *J Clin Periodontol* 1996; 23:346-354.
- Ramseier CA. Potencial impact of subject-based risk factor control on periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32(suplemento 6): 283-90.
- Reddy J, Africa CW, Parker JR. Darkfield microscopy of subgingival plaque of an urban black population with poor oral hygiene. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 578-82.
- Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, Kay SL, Zhu X, DeRouen TA, Adams DF. Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *J Peridontol* 1996; 67:109-115.
- Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. Mini review. *J Periodont Res* 2005; 1-9.
- Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, DelleMijn-Kippuw N, Simon R, Winkel EG. Differences in the composition of the subgingival Microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 383-92.
- Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB Jr, Line SR. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 341-5.
- Schenkein HA, Best AM, Gunsolley JC. Influence of race and periodontal clinical status on neutrophil chemotactic responses. *J Periodontal Res* 1991(26): 272-5.
- Schenkein HA. Finding genetic risk factors for periodontal diseases: is the climb worth the view? *Periodontol* 2000 2002; 30: 79-90.

- Segersten U, Correa P, Hewison, Hellman P, Dralle H, Carlin T, Akerstrom G, Westin G. 25-Hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase expression in normal and pathological parathyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2967-72.
- Simonson LG, Goodman CH, Morton HE. Quantitative immunoassay of *Treponema denticola* serovar C in adult periodontitis. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1493-1496.
- Smith GLF, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4: 47-51.
- Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol* 1991; 8: 766-75.
- Socransky SS; Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000 1994; (5): 7-25.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster JB, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA Hybridization. *Biotechniques* 1994; 17: 788-92.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini M A, Smith C & Kent RL Jr Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-44.
- Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Duff GW. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 810-18.
- Socransky SS & Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28:12-55.
- Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002; 29:260-268.
- Socransky SS & Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005; 38: 135-87.
- Sun JL, Meng HX, Cao CF, Tachi Y, Shinohara M, Ueda M et al. Relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and periodontitis. *J Periodont Res* 2002; 37: 263-67.
- Tachi Y, Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Shinohara M, Ueda M *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. *Life Science* 2003; 73: 3313-21.
- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2001; 72:1354-1363.

- Tanner ACR, Haffer C, Brathall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979; 6: 278-307.
- Tanner A, Kent R, Maiden MFJ, Taubman, MA. *J Perio Res* 1996; 31: 195-204.
- Tanner A, Maiden MFJ, Macuch PJ, Murray LL, Kent Jr, RL. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 85-98.
- Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol* 1993; 64: 416-31.
- Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Mohler JL, Bell DA. Association of prostate cancer with vitamin D receptor polymorphism. *Cancer Research* 1996; 56: 4108-10.
- Tran SD, Rudney JD, Sparks BS, Hodges JS. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J Peridontol* 2001; 72:1-10.
- Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odonto-Stomatol* 2000; 18 (1): 6-9.
- Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1992; 13: 719-64.
- Uygur C, Hart T, Zhang Y, Firatli E. Association of vitamin D receptor polymorphism with Turkish periodontitis patients. *J Dent Res* 2002; resumo n. 2270.
- Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ. Vitamin D3 receptor as a target for breast cancer prevention. *Journal of Nutrition* 2003; 133: 2425S-2433S.
- Wilson T G Jr, Nunn M. The relationship between the interleukin-1 periodontal genotype and implant loss. Initial data. *J Periodontol* 1999; 70: 724-29.
- Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 2004; 75:1077-1083.
- Yano-Higuchi K, Takamatsy N, He T, Umeda M, Ishikawa I. Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on subgingival microbiota of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27:597-602.

Yoshihara A, Sugita N, Yamamoto K, Kobayashi T, Miyazaki H, Yoshie H. Analysis of vitamin D and Fc γ receptor polymorphisms in Japanese patients with generalized early-onset periodontitis. *J Dent Res* 2001; 80: 2051-54.

van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 1023-28.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000(a); 27: 648-57.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000(b); 27: 722-32.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS. The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 2000(c); 27:637-47.

Zambon JJ. Periodontal disease: microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1(1): 879-925.

ANEXOS**ANEXO A****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Por esse instrumento particular declaro, para os efeitos éticos e legais, que eu (nome) _____, (nacionalidade) _____, (profissão) _____, portador do R.G. _____, C.I.C. _____, residente e domiciliado à Rua _____, telefone _____, na cidade de _____, Estado de _____, concordo em participar da pesquisa **Perfil microbiológico e polimorfismo no gene do receptor da vitamina D em indivíduos com periodontite crônica**. Estou ciente que essa pesquisa pretende identificar os microrganismos (bactérias) presentes na placa dentária de indivíduos com doença periodontal e outros sem doença periodontal. Além disso, também estudará a influência da defesa do hospedeiro na progressão da doença periodontal. A doença periodontal é a inflamação das gengivas e pode levar até a perda dos dentes. É causada pela presença de placa dentária, uma camada localizada na superfície dos dentes e composta por microrganismos (bactérias) que causam a inflamação das gengivas. Para participar desse estudo é necessário estar com boa saúde geral, não ter sofrido tratamento nas gengivas, nem tomado antibióticos ou utilizado bochechos nos últimos 6 meses, e quando mulheres, não estar grávida ou amamentando. Esta pesquisa avaliará dois grupos de indivíduos: com a doença periodontal e sem a doença periodontal.

Os participantes serão submetidos a um exame completo dos dentes e das gengivas que será efetuado por profissionais formados em Odontologia, sob a supervisão de professores na Clínica Odontológica da UnG. Nesta oportunidade, amostras de placa dentária serão coletadas por meio de curetas odontológicas estéreis, para a realização do exame microbiológico e identificação dos microrganismos envolvidos na doença periodontal, sendo uma amostra de cada dente presente na boca. Para a avaliação de fatores da defesa do hospedeiro (polimorfismo do receptor da vitamina D), o indivíduo deverá realizar um bochecho com uma solução de glicose para a coleta de células epiteliais.

Guarulhos, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do Voluntário

Dra. Magda Feres – CRO-SP 77.854
Pesquisador Responsável

(continuação)

Os procedimentos são simples, não oferecem risco além de leve incômodo na gengiva durante a realização do exame clínico e coleta de placa dentária. Os benefícios recebidos serão os seguintes: todos os indivíduos participantes deste estudo receberão informações sobre a importância da higiene oral para a saúde geral do indivíduo. O tratamento da infecção periodontal está garantido na Clínica Odontológica da UnG para os participantes do estudo. Indivíduos que necessitarem de outros tratamentos serão encaminhados às diferentes especialidades na Clínica de Graduação.

Recebi todas as informações sobre a minha participação nesse estudo, e a garantia de novos esclarecimentos que julgar necessários durante o decorrer da pesquisa. Também fui informado sobre os benefícios e possíveis riscos inerentes ao tratamento odontológico convencional, assim como, todos os passos desse experimento serão realizados por profissionais com experiência e acompanhados por um Pesquisador Responsável.

Tomei conhecimento de que não terei custos extras e que tenho plena liberdade para recusar a participação na referida pesquisa a qualquer momento, sem penalização alguma. Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e a publicação dos dados e resultados obtidos do relatório geral da pesquisa. Recebi a garantia do sigilo que assegura a privacidade dos participantes do estudo, uma vez que os dados obtidos são confidenciais.

Por estar de pleno acordo com o presente termo, assino abaixo o mesmo.

Guarulhos, ____ de _____ de 200 __ .

Assinatura do Voluntário

Dra. Magda Feres – CRO-SP 77.854
Pesquisador Responsável

Contato com o Pesquisador Responsável:

Telefone: 6464.1769

ANEXO B

ANEXO C

