



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

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE INDIVÍDUOS
PORTADORES DE DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA
E AGRESSIVA GENERALIZADA**

MICHELLE LUBA

1º Orientador: Prof.^a Dr.^a Luciene C. de Figueiredo

2º Orientador: Prof.^a Dr.^a Magda Feres

Guarulhos

2006



MICHELLE LUBA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE INDIVÍDUOS
PORTADORES DE DOENÇA PERIODONTAL CRÔNICA
E AGRESSIVA GENERALIZADA**

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

1º Orientador: Prof.^a Dr.^a Luciene C. de Figueiredo

2º Orientador: Prof.^a Dr.^a Magda Feres

Guarulhos

2006

AGRADECIMENTOS

À Universidade Guarulhos, instituição onde tive a oportunidade de dar um importante passo rumo ao crescimento científico e profissional.

Aos meus pais, pelo constante apoio e incentivo à realização dos nossos sonhos.

Ao Fernando, meu marido, que esteve ao meu lado durante todo o curso.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Luciene Figueiredo pela competente orientação, colaboração e compreensão em todos os momentos.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Magda Feres, um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pedrosa Ferraz, pelo incentivo à continuidade dos meus estudos.

À bióloga Izilvânia Q. Barreto, por sua essencial ajuda durante a realização da fase laboratorial do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UnG, Profa Dra Magda Feres, Luciene Figueiredo, Jamil Awad Shibli, Sheila C. Cortelli, Cristiane M. Amaral, Poliana M. Duarte, José A. Rodrigues, Cláudia Ota-Tsuzuki pelos ensinamentos transmitidos, pelo exemplo profissional e pela amizade constante.

Aos funcionários que de alguma forma contribuíram para os meus trabalhos durante este período.

Aos pacientes e aos voluntários que contribuíram de forma significativa para o meu aprendizado e para a execução deste trabalho.

Às amigas Juliana Lucchezi, Flávia Matarazzo e Paula Soldani, pela companhia e carinho durante todo o curso.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

O objetivo deste estudo transversal foi analisar o perfil microbiano subgengival por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* em uma população brasileira portadora de doença periodontal crônica e agressiva generalizada. Para tal finalidade, foram selecionados 72 indivíduos, sendo 30 indivíduos portadores de doença periodontal crônica (grupo PC), 12 com periodontite agressiva generalizada (grupo PA) e 30 periodontalmente saudáveis (grupo S). Os parâmetros clínicos analisados foram Profundidade à Sondagem (PS-mm), Nível Clínico de Inserção (NCI-mm), presença ou ausência de placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração. Amostras de biofilme subgengival foram coletadas de 9 sítios méso-vestibulares nos indivíduos do grupo S e de 9 sítios (rasos \leq 3mm, intermediários 4-6mm e profundos \geq 7mm) nos indivíduos dos grupos PC e PA, sendo posteriormente avaliadas em relação a 38 espécies bacterianas por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Em relação aos parâmetros clínicos, os grupos PA e PC foram homogêneos e apresentaram as maiores médias de PS, NCI, percentual de sítios com SS e SUP em comparação aos indivíduos periodontalmente saudáveis. O grupo PC demonstrou o maior percentual de sítios com placa bacteriana visível, enquanto os grupos PA e S foram semelhantes. O grupo PC apresentou níveis médios de contagem total das espécies analisadas significativamente maiores ($37,1 \times 10^6$) do que os grupos PA ($21,7 \times 10^6$) e S ($2,7 \times 10^6$). *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado em elevadas contagens, proporções e percentual de sítios colonizados em indivíduos do grupo PA quando comparados aos indivíduos periodontalmente saudáveis ($p < 0,001$). Os complexos laranja e vermelho representaram as maiores proporções no grupo PC (30,6% e 24,9%, respectivamente) e no grupo PA (32,3% e 31,1%, respectivamente), porém sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Por outro lado, os indivíduos periodontalmente saudáveis apresentaram apenas 4,3% de complexo vermelho. O grupo PA apresentou as menores proporções (5,2%) das espécies de *Actinomyces* em comparação aos grupos PC (17,7%) e S (32,9%), estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Em conclusão, a composição microbiana subgengival de indivíduos com PC e PA diferem marcadamente da observada em indivíduos periodontalmente saudáveis. Além disso, discretas diferenças no perfil geral de colonização foram observadas em relação às duas formas da doença.

Palavras-chaves: doença periodontal agressiva, doença periodontal crônica, microbiota subgengival.

ABSTRACT

The purpose of the present investigation was to analyze the subgingival microbial profile through the Checkerboard DNA-DNA Hybridization technique in a Brazilian population with chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. To this end, 72 subjects were selected, being 30 with chronic periodontitis (ChP), 12 subjects with generalized aggressive periodontitis (GAgP) and 30 healthy (H). The analyzed clinical parameters were: probing pocket depth (PD-mm), clinical attachment level (AL-mm), presence or absence of visible dental plaque, gingival bleeding, bleeding on probing and suppuration. Samples of subgingival biofilm were collected from 9 mesial surfaces in the subjects of the group S and of 9 sites (shallow < 3mm, medium 4-6mm and deep >7mm) in the individuals of the groups GAgP and ChP, being appraised later in relation to 38 bacterial species through the Checkerboard DNA-DNA Hybridization technique. In relation to the clinical parameters, the groups GAgP and ChP were homogeneous and they presented the highest average percentiles of PD and AL sites with SS and SUP in comparison to the healthy subjects. The group ChP demonstrated the highest percent of colonies with visible bacterial plaque, while the GAgP and H were similar. The group ChP presented medium levels of total counts of the analyzed species significantly higher (37.1×10^6) than the groups GAgP (21.7×10^6) and H (2.7×10^6). *A. actinomycetemcomitans* was found in high counts, proportions and the percentile of colonies colonized in subjects of the group GAgP when compared to the healthy subjects ($p < 0.001$). The complexes orange and red represented the largest proportions in the group ChP (30.6% and 24.9%, respectively) and in the group GAgP (32.3% and 31.1%, respectively), however without significant statistical differences among the groups. On the other hand, the healthy subjects only presented 4.3% of red complex and the largest proportions (32.9%) of the species of *Actinomyces* in comparison with the groups ChP (17.7%) and AP (5.2%), is statistically similar ($p > 0.05$). In conclusion, the subgingival microbiota of ChP and GAgP markedly differed from H subjects. Additionally, slight differences in the overall profile of colonization were observed between these two forms of disease.

Key-words: Aggressive periodontitis, chronic periodontitis, subgingival microbiota.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA separadas por complexos bacterianos.....	14
Tabela 2. Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival.....	19
Tabela 3. Média (\pm dp) dos parâmetros clínicos nos grupos Periodontite Crônica (PC), Periodontite Agressiva (PA) e Saudável (S).....	21
Tabela 4. Freqüências médias de sítios de acordo com diferentes categorias de Profundidade à Sondagem e Nível Clínico de Inserção, nos grupos Periodontite Crônica (PC) e Periodontite Agressiva (PA).....	22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação gráfica do *Minislot* (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e deposição das amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*) 15
- Figura 2.** Representação gráfica do *Miniblotter* (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*)..... 16
- 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*) 17
- 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 18
- Figura 5.** Perfil microbiano das médias de contagem ($\times 10^5$), da proporção das sondas de DNA e do percentual de sítios colonizados das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos com periodontite crônica e 30 indivíduos periodontalmente saudáveis. Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas..... 27

Figura 6. Perfil microbiano das médias de contagem ($\times 10^5$), da proporção das sondas de DNA e do percentual de sítios colonizados das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada e 30 indivíduos periodontalmente saudáveis. Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas..... 28

Figura 7. Perfil microbiano das médias de contagem ($\times 10^5$), da proporção das sondas de DNA e do percentual de sítios colonizados das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos com periodontite crônica e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas..... 29

Figura 8. Média das proporções dos complexos microbianos descritos por Socransky *et al.* (1998), presentes nas amostras de biofilme subgengival dos 3 grupos experimentais. As áreas dos gráficos foram ajustadas para refletir a contagem total das espécies bacterianas em cada grupo. Análise de covariância ajustada para idade (* $p < 0,01$). Letras distintas nos complexos significam diferenças significativas entre os grupos..... 30

Figura 9. Perfil microbiano das médias de proporção de sondas de DNA das 38 espécies bacterianas analisadas nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos com periodontite crônica (sítios separados por categoria de profundidade à sondagem-PS, sendo rasos: ≤ 3 mm, intermediários: 4-6mm, profundos: ≥ 7 mm) e 30 indivíduos periodontalmente saudáveis (PS ≤ 3 mm). Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas 31

Figura 10. Perfil microbiano das médias de proporção de sondas de DNA das 38 espécies bacterianas analisadas nas amostras de biofilme subgengival de 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada (sítios separados por categoria de profundidade à sondagem-PS, sendo rasos: $\leq 3\text{mm}$, intermediários: 4-6mm, profundos: $\geq 7\text{mm}$) e 30 indivíduos periodontalmente saudáveis (sítios com PS $\leq 3\text{mm}$). Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas 32

Figura 11. Perfil microbiano das médias de proporção de sondas de DNA das 38 espécies bacterianas analisadas nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos com periodontite crônica e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada, sendo os sítios separados por categoria de Profundidade à Sondagem-PS: rasos ($\leq 3\text{mm}$), intermediários (4-6mm), profundos ($\geq 7\text{mm}$). Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas 33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	01
1.1. Etiologia da doença periodontal crônica	02
1.2. Etiologia da doença periodontal agressiva	03
1.3. Métodos para avaliação da composição da placa bacteriana ...	05
2. PROPOSIÇÃO	07
3. MATERIAL E MÉTODO	08
3.1. Seleção da amostra	08
3.2. Critérios de inclusão e exclusão	08
3.3. Avaliação clínica	09
3.3.1. Calibração dos examinadores	09
3.3.2. Parâmetros clínicos	10
3.4. Avaliação microbiológica	11
3.4.1. Seleção dos sítios-teste	11
3.4.2. <i>Checkerboard DNA-DNA Hybridization</i>	12
3.5. Análise estatística	19
4. RESULTADOS	21
4.1. Resultados clínicos	21
4.2. Resultados microbiológicos	23
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	50

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença periodontal acomete as estruturas de proteção e sustentação dos dentes e tem como fator etiológico microrganismos específicos presentes na placa bacteriana supra e subgingival (Løe *et al.*, 1965; Socransky, 1970; Listgarten *et al.*, 1978; Loesche *et al.*, 1985; Socransky & Haffajee, 1994; Haffajee & Socransky, 1994; Socransky *et al.*, 1998). A comprovação da natureza infecciosa da doença periodontal foi demonstrada por Løe e colaboradores na década de 60 após o estudo clássico sobre a “gingivite experimental” que demonstrou a relação existente entre o acúmulo de placa dentária e a inflamação gengival (Løe *et al.*, 1965). O reconhecimento da especificidade da placa subgingival e da existência de diferentes formas de infecções periodontais associadas a diferentes patógenos (Loesche 1976; Socransky & Haffajee, 1994), tem levado pesquisadores e clínicos a um melhor entendimento desse processo patológico e, eventualmente, à elaboração de terapias específicas, com maiores probabilidades de sucesso.

Neste contexto, a doença periodontal agressiva é uma infecção que acomete indivíduos sistemicamente saudáveis, normalmente jovens, caracterizada por uma severa perda de inserção clínica associada a uma rápida destruição óssea alveolar (Miller *et al.*, 1987; Tonetti & Mombeli, 1999; Armitage, 1999; Lang *et al.*, 1999). Esta forma de doença periodontal é classificada de maneira localizada ou generalizada, dependendo de sua extensão (Armitage, 1999; Lang *et al.*, 1999).

Existe um forte consenso na literatura quanto ao envolvimento da espécie bacteriana *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Norskov-Lauritsen *et al.*, 2006) anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, na etiopatogenia da doença periodontal agressiva (Slots *et al.*, 1980; Zambon *et al.*, 1985; Schenkein *et al.*, 1993; Tinoco *et al.*, 1997, Cortelli *et al.*, 2005). Porém, poucos estudos avaliaram de forma sistemática a composição da microbiota subgingival de indivíduos brasileiros com periodontite agressiva.

O advento de novas técnicas microbiológicas e o avanço na identificação de novas espécies de microrganismos vem demonstrando que alguns indivíduos portadores de doença periodontal agressiva não apresentam ou apresentam baixas proporções de *A. actinomycetemcomitans* (Han *et al.*, 1991; Kamma *et al.*, 2001; Mullally *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 1996; Trevilatto *et al.*, 2002; Kamma *et al.*, 2004)

ou de outros patógenos relacionados com a doença periodontal agressiva, tais como, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus* e *Fusobacterium ssp.* (Loesche *et al.*, 1985; Moore & Moore 1994; Mullally *et al.*, 2000; Kamma *et al.*, 2001). Esses dados sugerem que outras espécies bacterianas podem estar relacionadas com o início e a progressão desta infecção.

1.1. Etiologia da doença periodontal crônica

Os microrganismos presentes na placa dentária ou biofilme dental (Costerton *et al.*, 1999) localizada no sulco gengival e/ou bolsa periodontal assim como os subprodutos derivados do metabolismo microbiano são considerados o agente etiológico primário da doença periodontal (Pennel & Keagle, 1977; Loesche *et al.*, 1985). À medida que se estabelecem alterações inflamatórias no tecido gengival induzidas pela placa, ocorre um aumento tanto na quantidade de bactérias, como também alterações nos tipos morfológicos presentes nesta placa (Löe *et al.*, 1965). Os microrganismos, considerados periodontopatogênicos e associados tanto à gengivite quanto a uma ou mais formas de periodontite, são na maioria das vezes, Gram-negativos, anaeróbios, dotados de motilidade e, menos freqüentemente microaerófilos (Socransky, 1970; Socransky, 1977; Theilade, 1986; Socransky & Haffajee, 1994).

A busca dos fatores etiológicos associados às doenças periodontais iniciou-se há várias décadas. Estudos epidemiológicos (Schei *et al.*, 1959; Lovdal *et al.*, 1958; Russel, 1967; Löe *et al.*, 1965; Löe *et al.*, 1967; Theilade *et al.*, 1966), realizados na década de 60 mostraram uma relação positiva entre o acúmulo de placa dentária e a patogenia da doença, comprovando sua importância na etiologia das doenças periodontais. Seguindo esta filosofia, estabeleceu-se o conceito da “Hipótese da placa não-específica”, teoria que relacionava qualquer acúmulo de microrganismos na margem gengival à produção de fatores irritantes e, conseqüentemente, à inflamação gengival e à destruição periodontal (Theilade, 1986). O estudo clássico da “gengivite experimental” em humanos demonstrou conclusivamente, uma forte relação entre o acúmulo de placa, as alterações nas proporções dos tipos morfológicos bacterianos, e a inflamação gengival. Por outro

lado, o controle da placa dentária mostrou ser capaz de reverter o processo de inflamação gengival e levar as proporções microbianas e a um perfil associado à saúde periodontal (Løe *et al.*, 1965).

Uma grande contribuição para os novos conceitos do desenvolvimento da doença periodontal surgiu com os estudos de Løe *et al.* (1986) realizados com os plantadores de chá do Sri Lanka. Estes estudos observaram 480 plantadores de chá durante 15 anos, e demonstraram que 11% destes indivíduos, independentemente da presença massiva de depósitos de placa dentária, não apresentavam progressão da doença periodontal, contradizendo assim os princípios da inespecificidade da placa dentária (Løe *et al.*, 1978, Løe *et al.*, 1986). Nesta mesma época, outros estudos microbiológicos reconheceram certas manifestações periodontais, tais como a “periodontite juvenil localizada” e a “gengivite ulcerativa necrozante”, como sendo entidades clínicas distintas, causadas por microrganismos específicos, *A. actinomycetemcomitans* e *Treponema vicentii*, respectivamente (Listgarten, 1965; Slots, 1976; Haffajee *et al.*, 1984; Mandell *et al.*, 1987). Surgia então a “Hipótese da placa específica”, sustentada até os dias atuais, na qual a composição microbiana da placa dentária difere entre indivíduos e entre as diversas entidades clínicas periodontais, tais como periodonto saudável, gengivites e periodontites (Loesche, 1976).

A associação de microrganismos específicos com as diversas formas de doença periodontal permitiu e incentivou o desenvolvimento de métodos de diagnóstico baseados na detecção de uma ou mais espécies de bactérias, ou de alterações em sua proporção na placa (Bretz & Loesche, 1987; Loesche *et al.*, 1990). As pesquisas em periodontia voltaram-se então, a vista disso, para determinar quais os microrganismos, dentre as mais de 700 espécies bacterianas presentes na cavidade bucal (Kazor *et al.*, 2003), seriam os responsáveis pelo desenvolvimento da doença periodontal.

1.2. Etiologia da doença periodontal agressiva

A microbiota da doença periodontal agressiva é complexa, consistindo geralmente de bactérias anaeróbias Gram-negativas, tais como, *A.actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *C. rectus* e *Fusobacterium ssp.* (Loesche *et al.*, 1985; Moore & Moore 1994; Mullally *et al.*, 2000;

Kamma *et al.*, 2001). O papel de bactérias específicas, especialmente *A. actinomycetemcomitans* na forma localizada da doença periodontal agressiva tem sido extensivamente estudado em adolescentes e adultos jovens (Zambon, 1985; Schenkein *et al.*, 1993; Tinoco *et al.*, 1997; Cortelli *et al.*, 2005). Slots *et al.* (1980) analisando por meio de cultura microbiana amostras de biofilme subgengival de bolsas profundas de pacientes portadores de doença periodontal agressiva localizada encontraram em 9 dos 10 indivíduos analisados uma alta prevalência de *A. actinomycetemcomitans*. Entretanto, os relatos da prevalência deste patógeno em indivíduos jovens saudáveis e portadores de doença periodontal crônica são menores, principalmente em estudos realizados no Brasil (Cortelli *et al.*, 2005 Tinoco *et al.*, 1997). Outros estudos isolaram *A. actinomycetemcomitans* em cerca de 75 a 100% de amostras de bolsas periodontais ativas na doença periodontal agressiva (Zambon *et al.*, 1983; Christersson *et al.*, 1985; Mandell & Socransky, 1981; Zambon *et al.*, 1985; Russo *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Cortelli *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005), corroborando assim a relação existente entre este patógeno e a forma agressiva da doença periodontal.

Embora *A. actinomycetemcomitans* seja indicado como principal patógeno na doença periodontal agressiva, existem algumas controvérsias na literatura (Han *et al.*, 1991; Kamma *et al.*, 2001; Mullally *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 2002; Trevilatto *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2003; Gajardo *et al.*, 2005) Kamma *et al.* (2001) estudando uma população na Grécia e Mullally *et al.* (2000) na Irlanda do Norte, observaram por meio da técnica do PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) uma baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* (18,8 e 28%) em bolsas periodontais de indivíduos com doença periodontal agressiva localizada. Em outro estudo, Han *et al.* (1991) não isolaram *A. actinomycetemcomitans* em nenhuma das 23 amostras subgengivais obtidas de indivíduos chineses portadores da forma agressiva da doença periodontal. Trevilatto *et al.* (2002) estudaram uma família brasileira com doença periodontal agressiva (n=14) e relataram uma baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, questionando assim o valor do isolamento e a presença deste microrganismo como forma de diagnóstico (etiologia) para a doença periodontal agressiva. Recentemente, Gajardo *et al.* (2005) por meio de cultura microbiana isolaram *A. actinomycetemcomitans* em apenas 19,4% de bolsas periodontais de 30 indivíduos com doença periodontal agressiva em uma população chilena. Esta baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* na

população chilena já havia sido reportada por Lopez *et al.* (1996). Complementando, Mombelli *et al.* (2002), em uma revisão sistemática da literatura, relataram que a presença ou ausência de *A. actinomycetemcomitans* não pode ser um parâmetro para diferenciar indivíduos com doença periodontal agressiva e com a forma crônica da doença. Logo, estes estudos sugerem que outros microrganismos podem estar associados à etiologia da doença periodontal agressiva.

1.3. Métodos para avaliação da composição da placa bacteriana

Inúmeros métodos foram e têm sido utilizados para identificação dos microrganismos bucais. As técnicas de microscopia de contraste de fase e de campo escuro podem demonstrar diferenças de tamanho, forma e mobilidade dos microrganismos presentes na placa bacteriana. Porém, estes métodos microscópicos não diferenciam as espécies bacterianas (Loesche *et al.*, 1985; Beltrami *et al.*, 1987; Omar *et al.*, 1990; Furuichi *et al.*, 1997; Dahan *et al.*, 2004). A utilização do método de cultura, considerado um *gold standard*, é capaz de identificar diversos microrganismos presentes na placa bacteriana, além de ser extremamente importante para a busca de novas espécies e para a determinação da susceptibilidade microbiana à diferentes antibióticos (Newman & Socransky, 1977; Ali *et al.*, 1992; Lie *et al.*, 1995), entretanto, estima-se atualmente que a cavidade bucal apresente aproximadamente 700 espécies de bactérias, sendo que mais de 50% destas espécies ainda não foram cultivadas. Assim, outros microrganismos poderiam estar presentes na doença periodontal sem o devido conhecimento e caracterização (Paster *et al.*, 2001; Kazor *et al.*, 2003). Desta maneira, vários métodos independentes de cultura surgiram nos últimos anos com o objetivo de obter maiores informações sobre a composição da microbiota, baseados em sondas de DNA como o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, ou na reação em cadeia da polimerase qualitativa ou quantitativa usando PCR em tempo real. O método do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi desenvolvido por Socransky *et al.* (1994) e utiliza sondas genômicas de DNA para a identificação de até 40 espécies bacterianas em 28 amostras de placa bacteriana por teste. Esta técnica permite a elaboração de estudos de grande porte para o conhecimento da microbiota das doenças periodontais, propiciando a avaliação de um grande número de amostras e de microrganismos orais. As maiores vantagens deste método de diagnóstico incluem a

rápida identificação e a avaliação semiquantitativa dos microrganismos presentes nas amostras, a identificação de bactérias de difícil cultivo e o baixo custo. Sendo assim, o *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* tem sido utilizado com sucesso na avaliação da composição da microbiota subgengival e de outros nichos da cavidade oral (Haffajee *et al.*, 1997a, b; Feres *et al.*, 1999a,b; Cugini *et al.*, 2000; Ximénez-Fyvie *et al.*, 2000; Feres *et al.*, 2001; Favari *et al.*, 2006).

Neste contexto, Socransky *et al.* (1998) examinaram as relações existentes entre as espécies bacterianas na placa subgengival com a doença periodontal crônica. Utilizando o método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* avaliaram 13.261 amostras de placa subgengival. Os autores demonstraram a existência de associações entre as espécies bacterianas estudadas, as quais foram agrupadas da seguinte forma: complexo vermelho, composto por *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *Treponema denticola*; complexo laranja, composto por subespécies de *Fusobacterium nucleatum* (*Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum ssp. vincentii*), *Fusobacterium periodonticum*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter showae*, *C. rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*; complexo verde, formado por 3 espécies de *Capnocytophaga* (*Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*), *Eikenella corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a; complexo amarelo, formado por espécies de *Streptococcus* (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*) e complexo roxo, composto de *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. Espécies como *Selenomonas noxia*, *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b e *Actinomyces naeslundii* genospecie 2 não formaram complexos com outras espécies microbianas. Este mesmo estudo demonstrou, ainda, a existência de relações entre os complexos, de forma que, por exemplo, o complexo laranja precede a colonização do complexo vermelho. Também foram observadas as relações existentes entre certos complexos e aspectos clínicos da doença periodontal. Os parâmetros de profundidade à sondagem, sangramento à sondagem e nível de inserção clínica, por exemplo, mostraram relação direta com a presença das espécies do complexo vermelho e, em certa extensão, do complexo laranja.

2. PROPOSIÇÃO

* Analisar o perfil microbiano subgingival em uma população brasileira portadora de doença periodontal crônica e de doença periodontal agressiva generalizada, por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*, comparando-os com indivíduos periodontalmente saudáveis.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Seleção da amostra

Foram selecionados 72 indivíduos que procuraram tratamento na Clínica de Odontologia da Universidade Guarulhos (SP), constituindo-se três grupos: Periodontite Crônica - PC (n=30, indivíduos portadores de periodontite crônica), Periodontite Agressiva - PA (n=12, indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada) e Saudáveis - S (n=30, indivíduos periodontalmente saudáveis). A seleção foi realizada por três mestrandos em periodontia, sob a supervisão dos professores da disciplina de Periodontia. 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. Posteriormente, responderam a um questionário de saúde e foram submetidos a exame periodontal completo (anexo A) 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 aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Guarulhos (anexo B).

3.2. Critérios de inclusão e exclusão

3.2.1. Critérios de inclusão

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

Grupo Periodontite Crônica – PC

- 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 Periodontite Agressiva Generalizada – PA

- Ter idade igual ou inferior a 30 anos;
- Possuir no mínimo 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Possuir pelo menos 6 dentes com 1 sítio interproximal apresentando profundidade à sondagem e nível clínico de inserção maior do que 5 mm, não contíguos, localizados na região de incisivos e molares;
- Além disso, no mínimo outros três dentes com as mesmas características clínicas.

Grupo Saudável – S

- 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 > 4 mm, sendo aceitável no máximo 2 sítios por indivíduo com nível clínico de inserção igual a 5 mm, apenas em caso de retração.
- Não apresentar sinais clínicos de gengivite e não apresentar mais de 20% dos sítios com sangramento à sondagem.

3.2.2. 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.

3.3. Avaliação clínica

3.3.1. 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). O e.p.m. e o e.m.p. variaram entre 0,14mm-0,31mm e 4,3%-7,86%, respectivamente. 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, obtendo-se concordância superior a 92% (teste Kappa).

3.3.2. 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 & 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 & 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.

3.4. Avaliação microbiológica

3.4.1. Seleção dos sítios-teste

Grupo Periodontite Crônica - PC

Foram coletadas amostras de biofilme subgengival de 9 sítios por indivíduo, localizados em dentes com faces interproximais não-contíguas, nas seguintes categorias de profundidade à sondagem – PS: sítios rasos ($PS \leq 3\text{mm}$), intermediários (PS de 4 a 6 mm) e profundos ($PS \geq 7\text{mm}$). Sempre que possível foram incluídos sítios de todos os hemi-arcos. Quando o indivíduo não possuía 3 sítios com $PS \geq 7\text{ mm}$, foram coletados sítios intermediários (entre 4 e 6 mm) para completar os 9 sítios.

Grupo Periodontite Agressiva Generalizada – PA

Foram coletadas amostras de biofilme subgengival de 9 sítios por indivíduo, localizados em dentes com faces interproximais não-contíguas, nas seguintes categorias de profundidade à sondagem – PS: sítios rasos ($PS \leq 3\text{mm}$), intermediários (PS de 4 a 6 mm) e profundos ($PS \geq 7\text{mm}$). Sempre que possível foram incluídos sítios de todos os hemi-arcos. Quando o indivíduo não possuía 3 sítios com $PS \geq 7\text{ mm}$, foram coletados sítios intermediários (entre 4 e 6 mm) para completar os 9 sítios.

Grupo Saudável - S

Amostras de biofilme subgengival foram coletadas de 9 sítios méso-vestibulares selecionados ao acaso por meio de sorteio, contemplando pelo menos um dente por cada sextante.

Nos três grupos não foram selecionados sítios próximos ou em dentes com próteses mal-adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal.

3.4.2. Checkerboard DNA-DNA Hybridization

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.

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 gp 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).

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 9 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.

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 ssp. Nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Vincentii</i>	49256 ^a
Complexo Roxo		<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>Peptostreptococcus micros</i>	33270 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Prevotella intermédia</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>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a e b</i>	43718 ^a 29523 ^a	<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a	<i>Propionibacterium acnes I e II</i>	11827 ^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>	51146 ^a		
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a		

^a ATCC (American Type Culture Collection)

^b Forsyth Institute.

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* (Immunelect, 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* (Immunelect) 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* (Immunelect) e o DNA nela concentrado foi fixado por meio de aquecimento em forno a 120°C por 20 minutos.

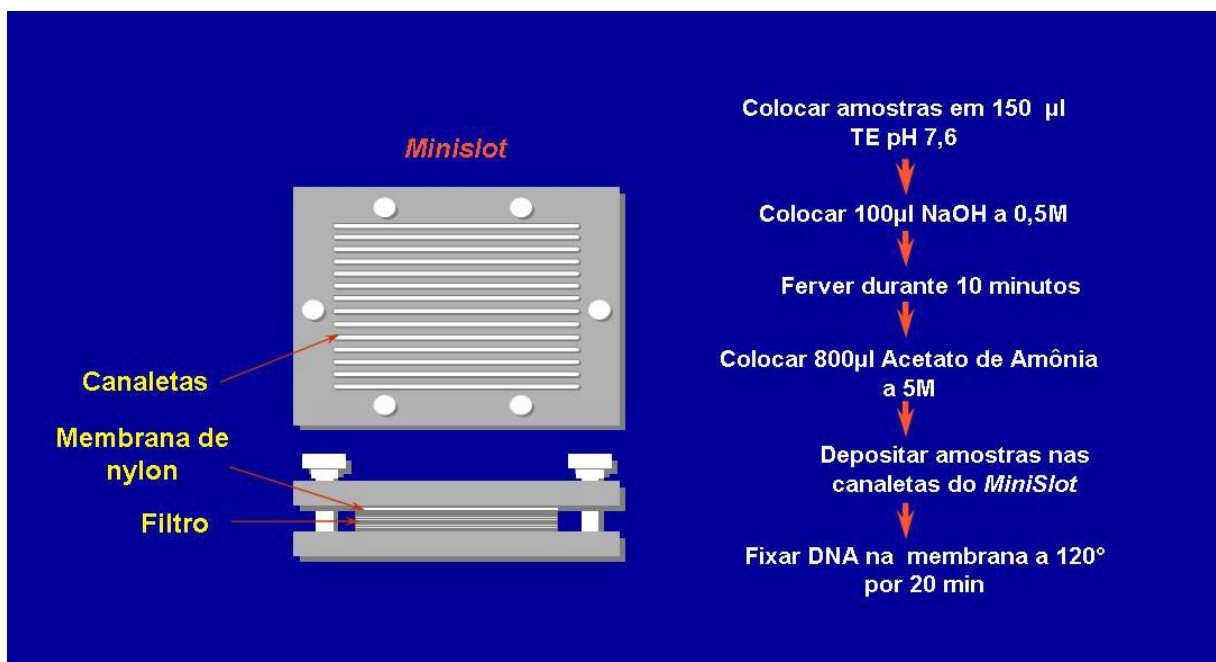


Figura 1. Representação gráfica do *Minislot* (Immunelect, Cambridge, MA, USA) e resumo da preparação e deposição das amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

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* (Immunelectrics, Figura 2) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* (Immunelectrics) 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.

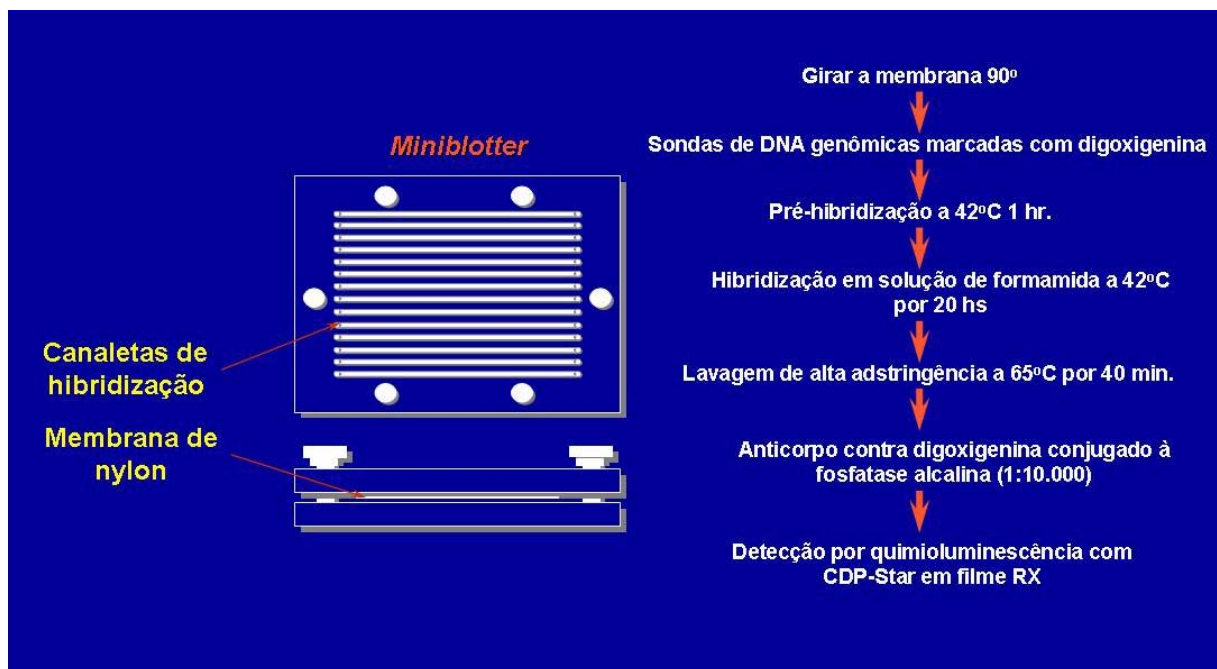


Figura 2. Representação gráfica do *Miniblotter* (Immunelectrics, Cambridge, MA, USA) e resumo das etapas de hibridização e deteção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* (Immunelectrics) 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-StarTM 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.

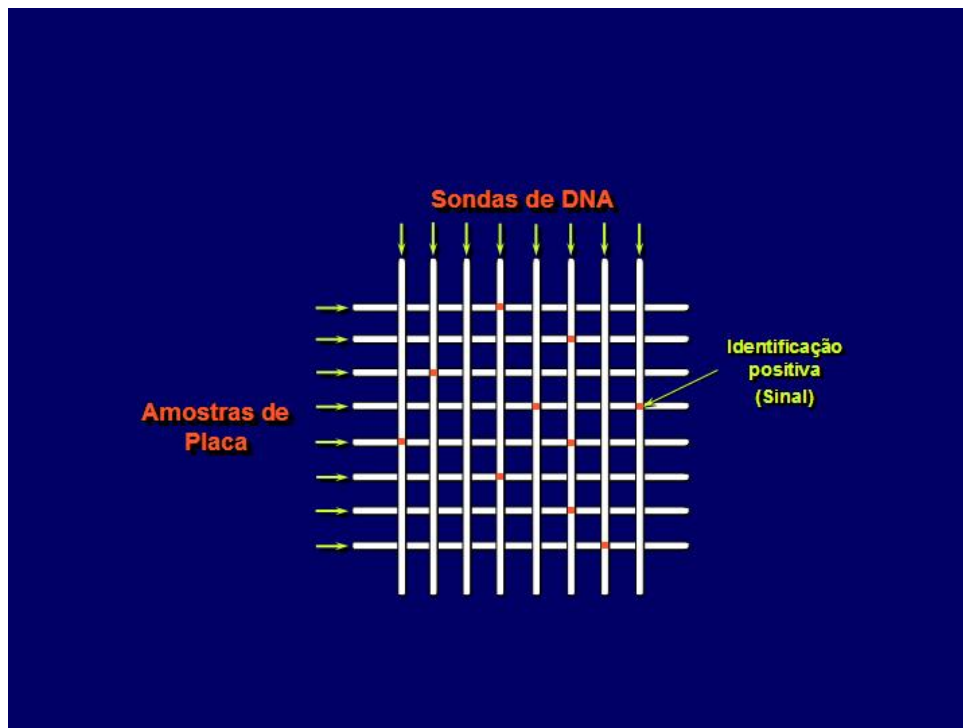


Figura 3. Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

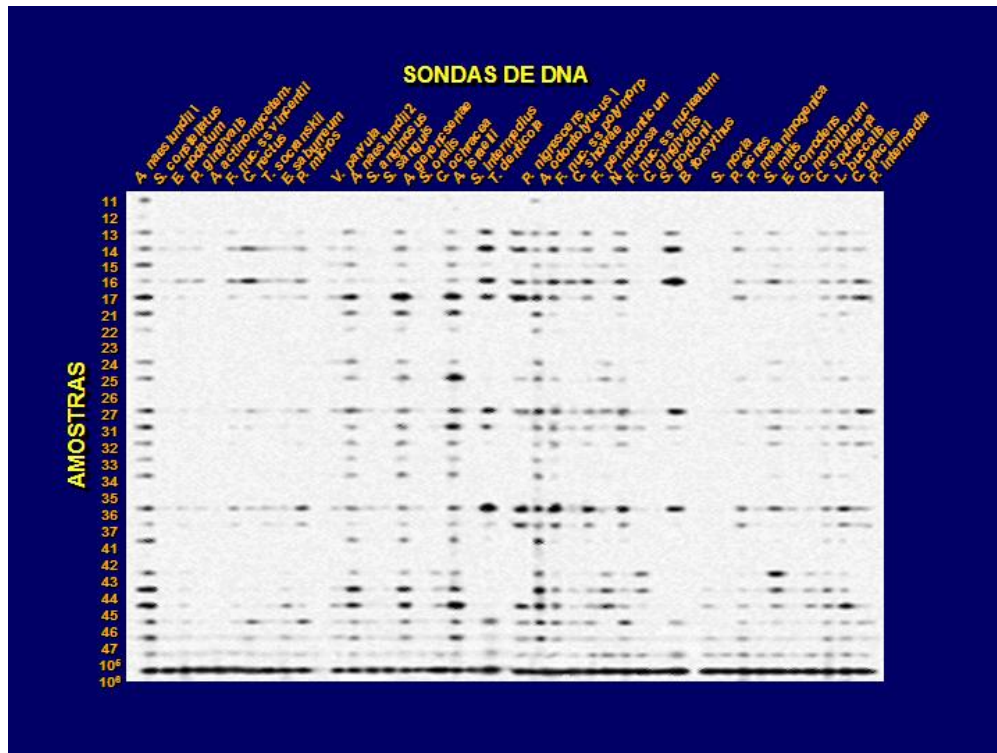


Figura 4. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*). Nesta figura estão apresentadas 40 bactérias, e as amostras de biofilme são de todos os dentes de um mesmo indivíduo.

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

3.5. Análise estatística

3.5.1. Análise clínica

A média das medidas clínicas de Profundidade à Sondagem e Nível Clínico de Inserção, assim com a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração foram computadas para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o Teste Kruskal-Wallis e o Teste U de Mann–Whitney. O teste Qui-quadrado foi utilizado para a variável gênero e para analisar as diferentes categorias de profundidade à sondagem nos grupos. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$).

3.5.2. Análise microbiológica

Os dados microbiológicos foram expressos em nível médio de cada espécie (contagem) em cada sítio. Estes níveis foram computados por indivíduo e depois dentro de cada grupo experimental. Diferenças nos níveis médios, nas proporções de microrganismos e na média de frequência de sítios colonizados dentro de cada grupo foram avaliadas por meio de Análise de Covariância. A significância estatística foi estabelecida em 5%. 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 $p \leq 0,002$.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados clínicos

A Tabela 3 apresenta os dados epidemiológicos e os valores médios dos parâmetros clínicos dos indivíduos dos três grupos experimentais. Os grupos PC e S foram homogêneos em relação à idade, entretanto o grupo PA apresentou média estatisticamente inferior aos demais grupos experimentais. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais em relação à distribuição do gênero (Teste Qui-quadrado). Foram observadas diferenças significativas entre os grupos para todas as variáveis clínicas. Em relação aos parâmetros clínicos, os grupos PA e PC foram homogêneos e apresentaram as maiores médias de PS, NCI, percentual de sítios com SS e SUP em comparação aos indivíduos periodontalmente saudáveis. O grupo PC demonstrou o maior percentual de sítios com placa bacteriana visível, enquanto os grupos PA e S foram semelhantes. O percentual de sítios com sangramento gengival foi menor nos indivíduos do grupo S, seguido dos grupos PA e PC, respectivamente.

Tabela 3. Média (\pm dp) dos parâmetros clínicos nos grupos Periodontite Crônica (PC), Periodontite Agressiva (PA) e Saudável (S).

Variáveis	Grupos		
	PC	PA	S
n (indivíduos)	30	12	30
Idade (anos)*	42,03 \pm 6,2 ^A	26,00 \pm 3,0 ^B	41,10 \pm 8,5 ^A
Gênero (m:f) [†]	8:22	3:9	6:24
Profundidade à Sondagem (mm)*	3,85 \pm 0,7 ^A	4,72 \pm 0,7 ^A	2,16 \pm 0,2 ^B
Nível Clínico de Inserção (mm)*	4,33 \pm 1,0 ^A	4,65 \pm 1,1 ^A	2,20 \pm 0,2 ^B
% sítios com			
Placa Visível*	84,73 \pm 10,7 ^A	53,30 \pm 14,8 ^B	43,74 \pm 17,8 ^A
Sangramento Gengival*	40,72 \pm 22,4 ^A	14,20 \pm 11,0 ^B	6,52 \pm 5,5 ^C
Sangramento à Sondagem*	63,63 \pm 20,2 ^A	69,90 \pm 16,2 ^A	27,73 \pm 20,5 ^B
Supuração*	3,09 \pm 3,7 ^A	4,21 \pm 3,19 ^A	0,0 ^B

m=masculino; f=feminino; [†]p>0,05 - Teste Qui-quadrado; * p<0,05 – Teste Kruskal-Wallis. Diferentes letras nas colunas indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Teste U de Mann-Whitney).

Uma descrição mais detalhada dos parâmetros clínicos PS e NCI dos indivíduos portadores de doença periodontal crônica ou doença periodontal agressiva generalizada está apresentada na Tabela 4. Foram avaliados clinicamente 3984 e 1937 sítios nos grupos PC e PA, respectivamente. De acordo com a Profundidade à Sondagem, os sítios foram categorizados em sítios rasos ($PS \leq 3\text{mm}$), sítios intermediários ($PS 4\text{-}6\text{mm}$) e sítios profundos ($PS \geq 7\text{mm}$). Em relação ao Nível Clínico de Inserção, este parâmetro foi categorizado em perdas leves ($NCI \leq 3\text{mm}$), perdas moderadas ($NCI 4\text{-}6\text{mm}$) e perdas avançadas ($NCI \geq 7\text{mm}$).

A distribuição das frequências médias de sítios de acordo com as diferentes categorias de Profundidade à Sondagem e Nível Clínico de Inserção, nos grupos PC e PA, revelou que as diferenças mais marcantes entre os grupos estão nos percentuais de sítios com PS e $NCI \geq 7\text{mm}$. Apenas 7,4% dos sítios dos indivíduos do grupo PC apresentaram $PS \geq 7\text{mm}$ e 13,7% dos sítios apresentaram perdas avançadas de inserção. No grupo PA estes percentuais foram superiores, sendo 19,8% e 20,5%, respectivamente.

Tabela 4. Frequências médias de sítios de acordo com diferentes categorias de Profundidade à Sondagem e Nível Clínico de Inserção, nos grupos Periodontite Crônica (PC) e Periodontite Agressiva (PA).

Variáveis	Grupos		
	PC (n = 30)	PA (n = 12)	
Número de sítios	3984	1937	
% sítios (n) com			
Profundidade à Sondagem (PS)			p*
$PS \leq 3\text{mm}$	55,8 (2218)	40,7 (788)	0,03
$PS 4\text{-}6\text{mm}$	36,8 (1469)	39,5 (765)	NS
$PS \geq 7\text{mm}$	7,4 (297)	19,8 (384)	0,01
Nível Clínico de Inserção (NCI)			
$NCI \leq 3\text{mm}$	46,9 (1869)	40,0 (783)	NS
$NCI 4\text{-}6\text{mm}$	39,4 (1567)	39,5 (765)	NS
$NCI \geq 7\text{mm}$	13,7 (548)	20,5 (389)	0,01

*Teste Qui-quadrado; NS=Diferença não significativa.

4.2. Resultados microbiológicos

4.2.1. Médias de contagem ($\times 10^5$), das proporções de sondas de DNA e do percentual de sítios com contagens iguais ou superiores a 10^6 espécies bacterianas

A Figura 5 apresenta a média de contagem ($\times 10^5$), a média da proporção das sondas de DNA e a média do percentual de sítios com contagens iguais ou superiores a 10^6 espécies bacterianas nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis e 30 indivíduos com periodontite crônica. Os indivíduos com periodontite crônica demonstraram contagens significativamente superiores para todas as espécies analisadas em comparação aos indivíduos saudáveis, após o ajuste para comparações múltiplas. As espécies encontradas em maiores proporções nos indivíduos com periodontite crônica foram *C. rectus*, *E. nodatum*, *P. micros*, *P. nigrescens*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *Leptotrichia buccalis* e *S. noxia*, enquanto *A. naeslundii 1* e *S. oralis* estavam em altas proporções nos indivíduos periodontalmente saudáveis. Vinte e nove espécies apresentaram proporções mais elevadas de sítios colonizados com $\geq 10^6$ no grupo PC em comparação ao grupo S, sendo que dentre tais espécies estão incluídas as três do complexo vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*), 11 espécies do complexo laranja, e outras espécies consideradas possíveis patógenos tais como *S. noxia* e *T. socranskii*.

A média de contagem ($\times 10^5$), a média da proporção das sondas de DNA e a média do percentual de sítios com contagens iguais ou superiores a 10^6 frente às 38 espécies bacterianas analisadas em amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada estão apresentadas na Figura 6. Os níveis de contagem das 19 espécies foram significativamente diferentes entre os grupos PA e S. Destas, 18 espécies estavam em níveis superiores no grupo PA incluindo dez espécies do complexo laranja e as três espécies do complexo vermelho, enquanto *A. naeslundii genospecies 1* estava em níveis superiores no grupo S ($p < 0,001$). Considerando as proporções destas espécies, *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii 1*, *S. sanguinis* e *C. ochracea* demonstraram proporções significativamente superiores nos indivíduos periodontalmente saudáveis ($p < 0,001$). Já as espécies *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *P. nigrescens*, *T.*

forsythia, *P. gingivalis*, *T. denticola* foram encontradas em proporções significativamente superiores no grupo PA. As principais diferenças significativas no percentual de sítios colonizados com níveis $\geq 10^6$ bactérias foram observadas nas espécies dos complexos laranja e vermelho. Além disso, vale destacar que *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado em contagens, proporções e percentual de sítios colonizados superiores no grupo PA quando comparado ao grupo de indivíduos periodontalmente saudáveis ($p < 0,001$).

A Figura 7 apresenta a média de contagem ($\times 10^5$), a média da proporção das sondas de DNA, e a média do percentual de sítios com contagens iguais ou superiores a 10^6 para as 38 espécies analisadas em amostras de biofilme subgingival de 30 indivíduos com periodontite crônica e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada. *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii 1*, *S. sanguinis*, *C. ochracea* e *P. intermedia* foram encontradas em níveis significativamente superiores nos indivíduos com periodontite crônica, enquanto *P. gingivalis* e *V. parvula* em indivíduos com periodontite agressiva ($p < 0,001$). O grupo PA apresentou proporções significativamente superiores de *Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum*, enquanto *A. naeslundii 1* foi encontrado em altas proporções no grupo PC. Os indivíduos com periodontite crônica demonstraram um percentual de sítios colonizados por *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii 1* e *C. ochracea* significativamente superior em comparação aos indivíduos com periodontite agressiva.

4.2.2. Proporções dos complexos microbianos

As proporções dos complexos microbianos estão apresentadas na Figura 8. A área dos gráficos foi ajustada para refletir a diferença da contagem total de bactérias nas amostras de biofilme subgingival entre os grupos experimentais. As espécies bacterianas identificadas por meio das sondas de DNA foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Socransky *et al.* (1998). As proporções das espécies pertencentes a cada complexo foram somadas e a proporção total de cada complexo foi determinada. A contagem total das 38 espécies bacterianas subgingivais foi de $37,1 \times 10^6$ para o grupo PC, $21,7 \times 10^6$ para o grupo PA e $2,7 \times 10^6$ para o grupo S, sendo que estes resultados foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p < 0,01$). Os complexos laranja e vermelho representaram as maiores proporções no grupo PC (30,6% e 24,9%,

respectivamente) e no grupo PA (32,3% e 31,1%, respectivamente), porém sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Por outro lado, os indivíduos periodontalmente saudáveis apresentaram apenas 4,3% de complexo vermelho. O grupo PA apresentou uma média de proporção significativamente inferior de *Actinomyces ssp.* (5,2%) em comparação aos grupos PC (17,7%) e S (32,9%), que se apresentaram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

4.2.3. Sítios categorizados de acordo com a profundidade à sondagem inicial

Com a finalidade de fazer uma avaliação mais detalhada do perfil microbiológico dos diferentes grupos experimentais, os sítios dos grupos PA e PC foram subdivididos em 3 categorias de profundidade à sondagem: rasas (≤ 3 mm), intermediárias (4-6mm) e profundas (≥ 7 mm). A análise estatística foi repetida, ou seja, os dados foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. Como os indivíduos pertencentes ao grupo S possuem apenas sítios rasos, os resultados foram repetidos em todas as categorias de profundidade à sondagem a fim de tornar possível a comparação entre os três grupos.

A Figura 9 apresenta a média da proporção das sondas de DNA nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis e 30 indivíduos com periodontite crônica, nas diferentes categorias de profundidade à sondagem. As proporções de *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* foram significativamente superiores no grupo PC em comparação ao grupo S, independentemente da categoria de profundidade à sondagem ($p < 0,001$). Alguns periodontopatógenos foram encontrados em proporções elevadas nos indivíduos do grupo PC, incluindo *P. intermedia*, *P. micros*, *F. nucleatum ssp. vincentii*, *E. nodatum*, *C. rectus* e *C. gracilis* em sítios profundos; *P. intermedia*, *P. micros* e *C. gracilis* em intermediários e *C. showae* em sítios rasos.

Por outro lado, algumas espécies foram encontradas em proporções mais reduzidas no grupo PC do que no grupo S, incluindo *C. ochracea* em sítios rasos; *A. naeslundii 1*, *S. gordonii* e *Streptococcus anginosus* em intermediários e *A. naeslundii 1* na categoria de sítios profundos.

A média da proporção das sondas de DNA nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos periodontalmente saudáveis e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada, nas diferentes categorias de profundidade à

sondagem, está apresentada na Figura 10. *P. gingivalis*, *T. denticola* e *P. intermedia* foram encontrados em proporções elevadas em todas as categorias de profundidade à sondagem do grupo PA, enquanto *A. naeslundii* 1 foi encontrado em proporções superiores nos indivíduos periodontalmente saudáveis quando comparados com os indivíduos com periodontite agressiva, nos sítios rasos, intermediários e profundos. Outra importante diferença significativa foi observada no grupo PA, incluindo altas proporções de *V. parvula* e *F. nucleatum ss polymorphum* em sítios rasos; *A. actinomycetemcomitans*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* em sítios intermediários e *A. actinomycetemcomitans*, *E. nodatum*, *F. nucleatum ssp. polymorphum* e *T. forsythia* em sítios profundos.

A Figura 11 apresenta a média da proporção das sondas de DNA nas amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos com periodontite crônica 12 indivíduos com periodontite agressiva, nas diferentes categorias de profundidade à sondagem. O grupo PC mostrou altas proporções de *A. gerencseriae*, *A. naeslundii* 1 e *C. sputigena* em sítios intermediários, e *A. gerencseriae* e *A. naeslundii* 1 em sítios profundos. Por outro lado, o grupo PA apresentou altas proporções de *V. parvula* e *F. nucleatum ss polymorphum* em sítios rasos; *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum ss polymorphum* e *P. gingivalis* em intermediários; e *F. nucleatum ssp. polymorphum* e *P. gingivalis* em sítios profundos.

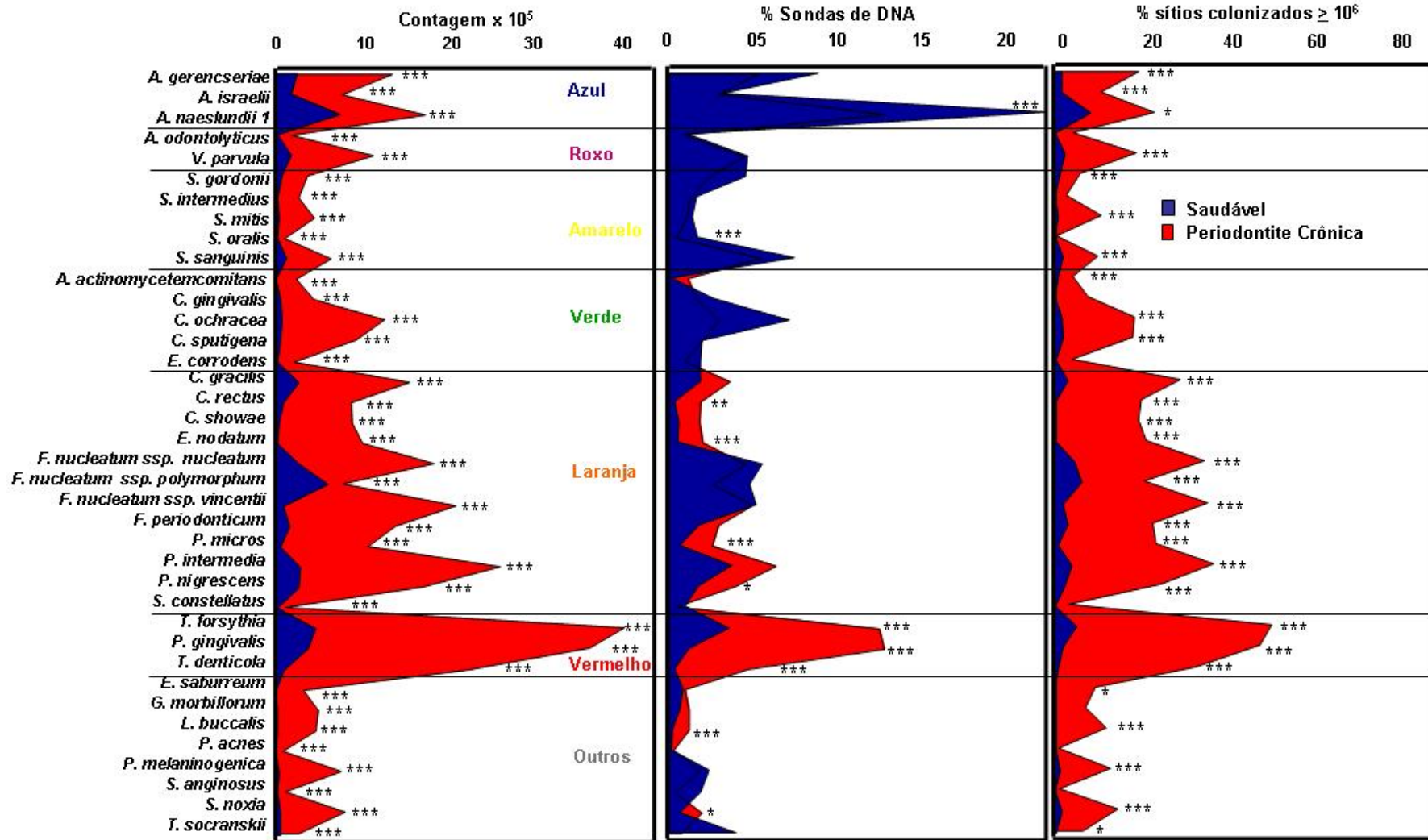


Figura 5. Perfil microbiano das médias de contagem ($\times 10^5$), da proporção das sondas de DNA e do percentual de sítios colonizados das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival de 30 indivíduos com periodontite crônica e 30 indivíduos periodontalmente saudáveis. Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

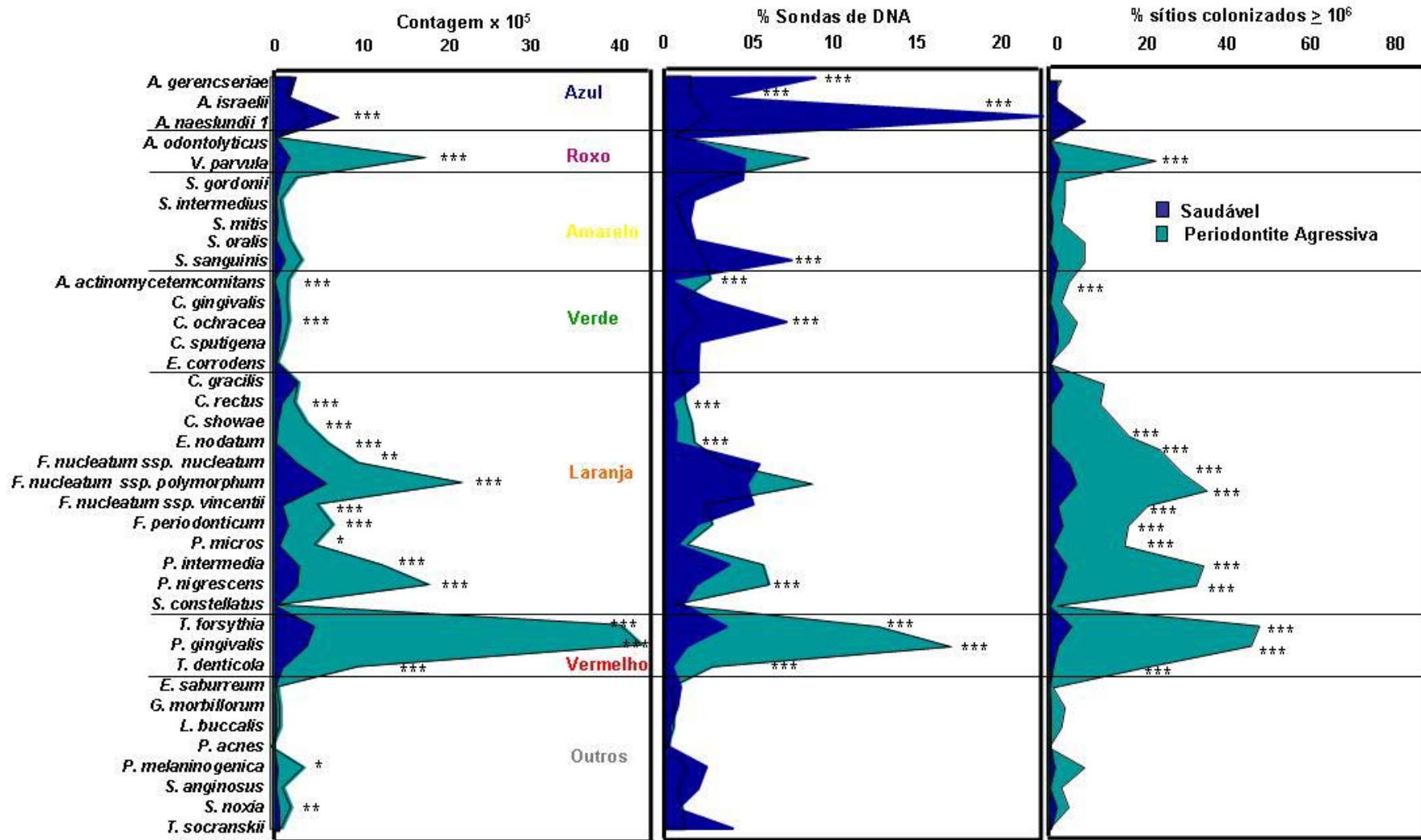


Figura 6. Perfil microbiano das médias de contagem ($\times 10^5$), da proporção das sondas de DNA e do percentual de sítios colonizados das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival de 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada e 30 indivíduos periodontalmente saudáveis. Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

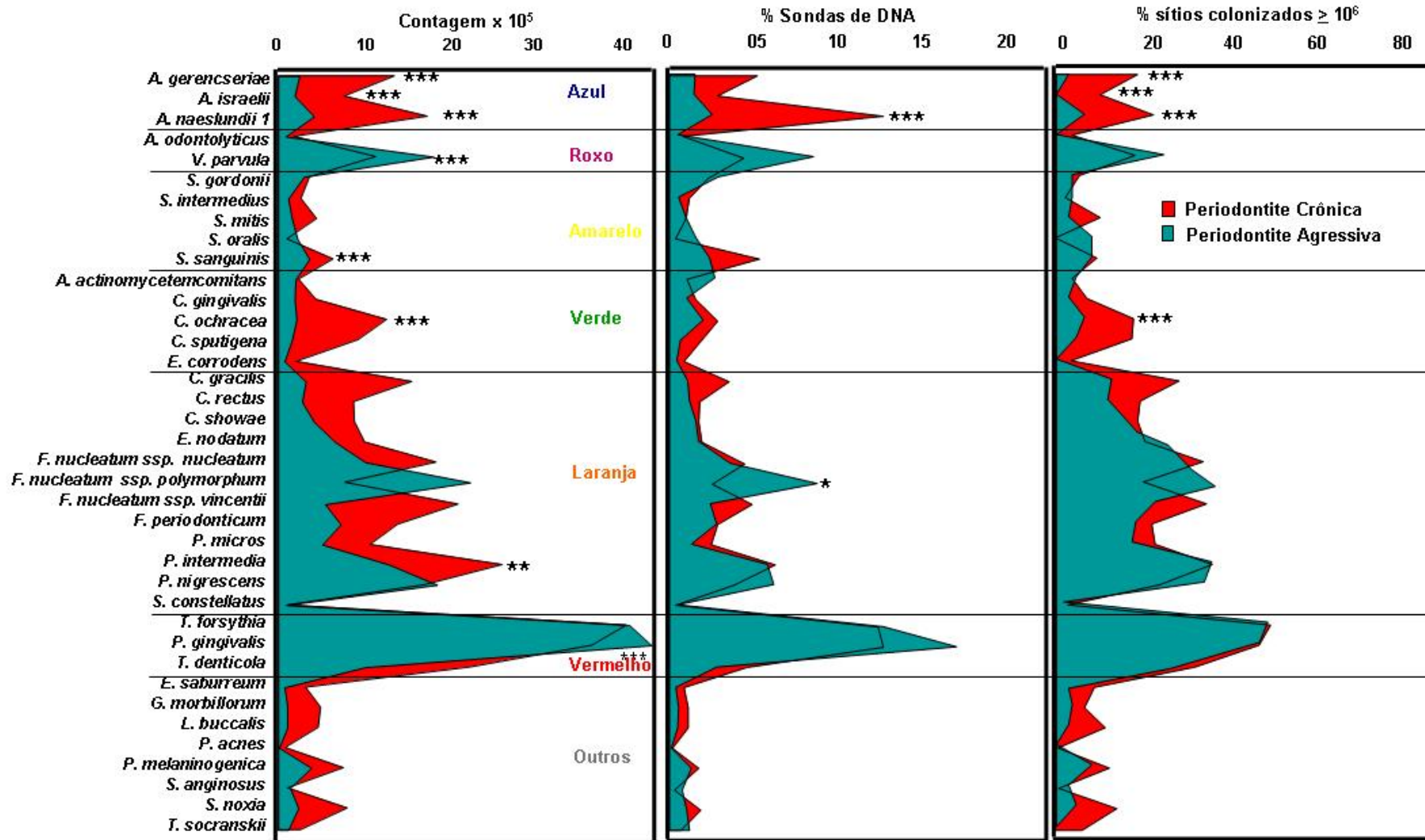


Figura 7. Perfil microbiano das médias de contagem ($\times 10^5$), da proporção das sondas de DNA e do percentual de sítios colonizados das 38 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival de 30 indivíduos com periodontite crônica e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

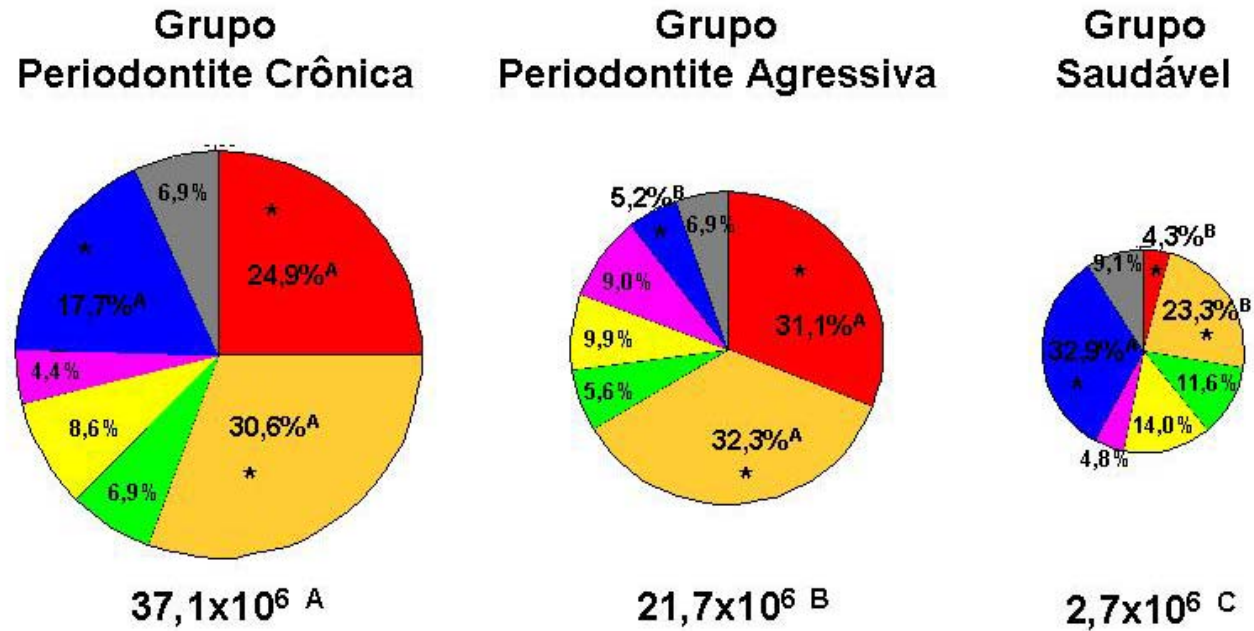


Figura 8. Média das proporções dos complexos microbianos descritos por Socransky *et al.* (1998), presentes nas amostras de biofilme subgengival dos 3 grupos experimentais. As áreas dos gráficos foram ajustadas para refletir a contagem total das espécies bacterianas em cada grupo. Análise de Covariância ajustada para idade (* $p < 0,01$). Letras distintas nos complexos significam diferenças significativas entre os grupos.

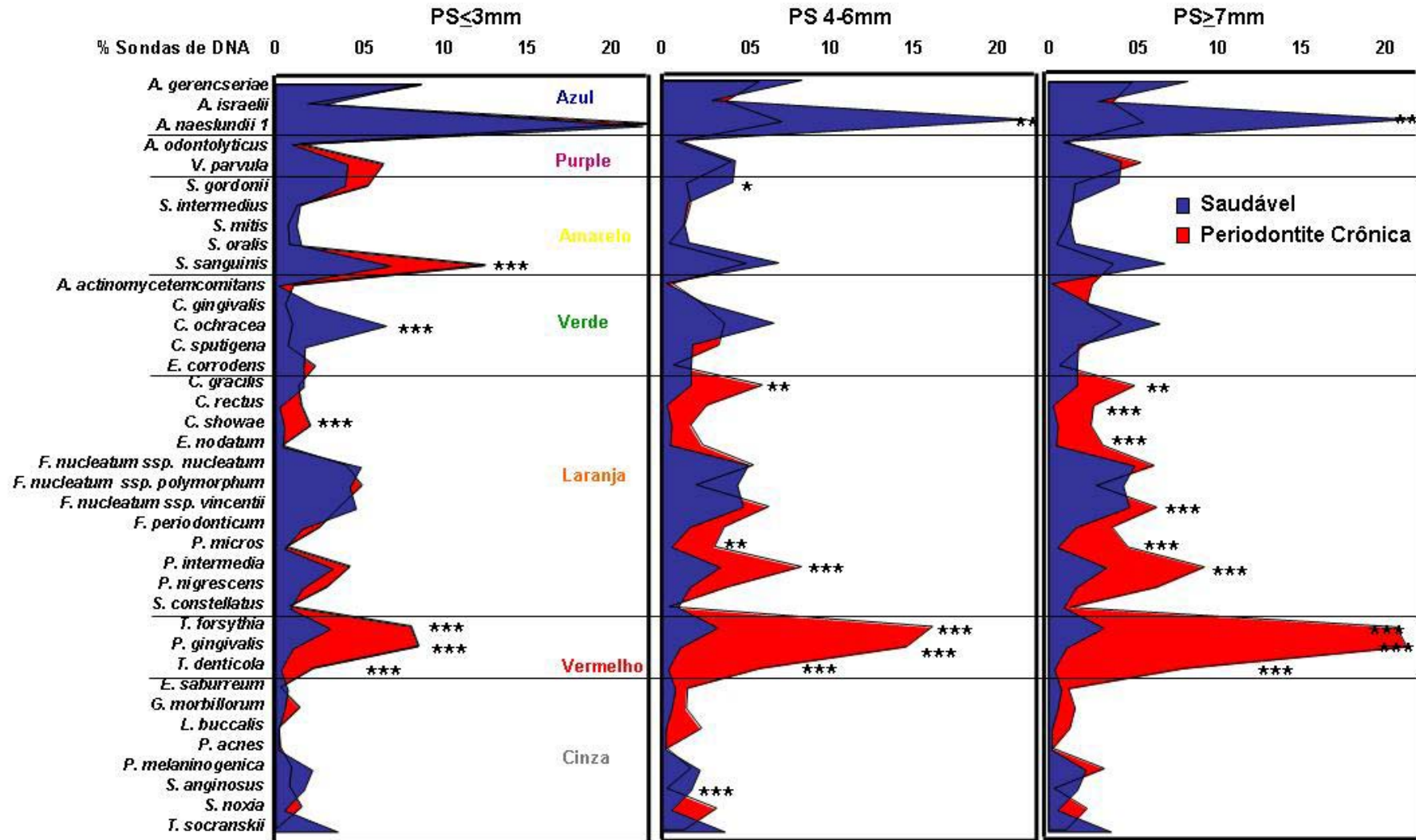


Figura 9. Perfil microbiano das médias de proporção de sondas de DNA das 38 espécies bacterianas analisadas nas amostras de biofilme subgingival de 30 indivíduos com periodontite crônica (sítios separados por categoria de profundidade à sondagem-PS, sendo rasos: ≤3mm, intermediários: 4-6mm, profundos: ≥7mm) e 30 indivíduos periodontalmente saudáveis (PS ≤3mm). Análise de covariância ajustada para idade: *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

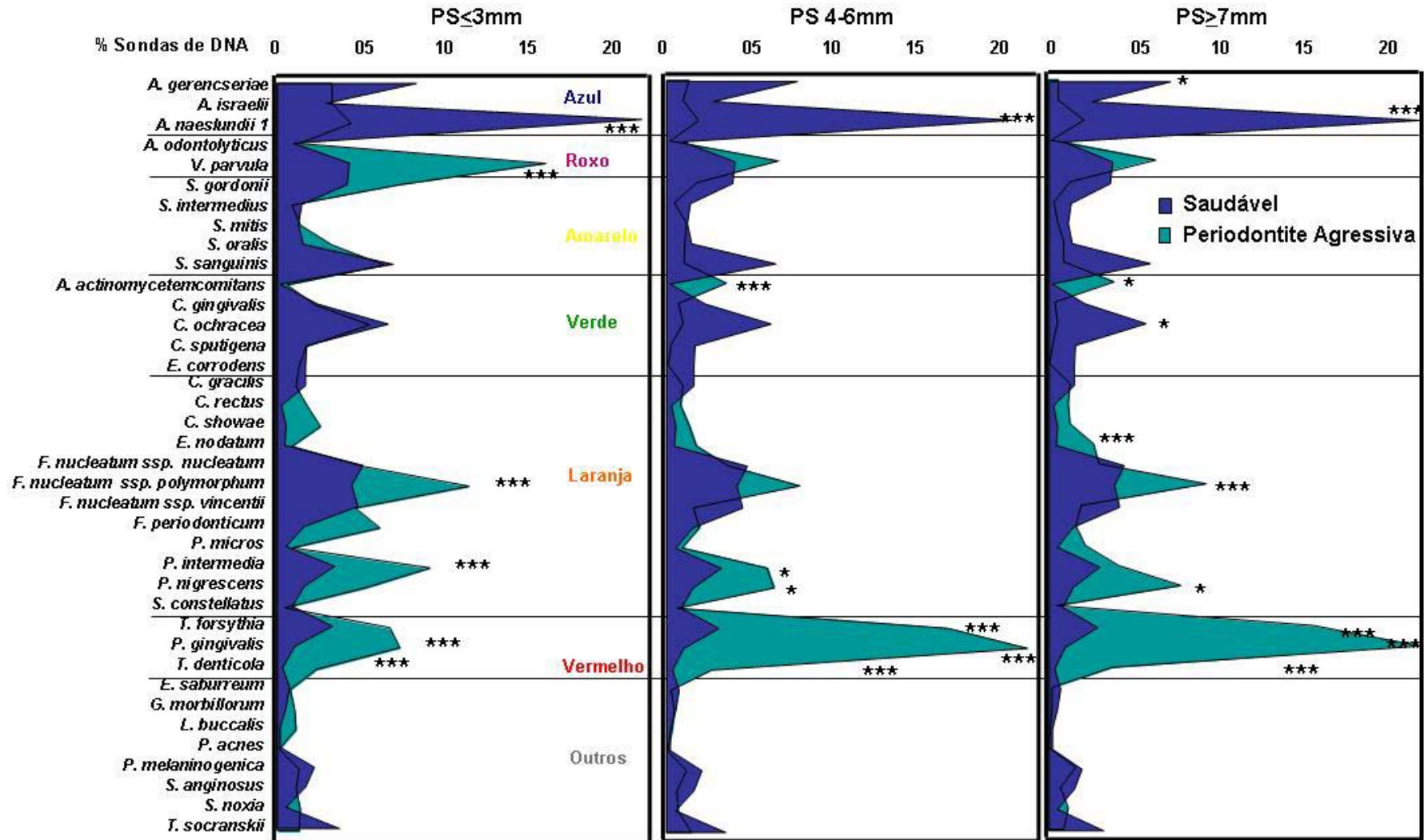


Figura 10. Perfil microbiano das médias de proporção de sondas de DNA das 38 espécies bacterianas analisadas nas amostras de biofilme subgingival de 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada (sítios separados por categoria de profundidade à sondagem-PS, sendo rasos: ≤3mm, intermediários: 4-6mm, profundos: ≥7mm) e 30 indivíduos periodontalmente saudáveis (PS ≤3mm). Análise de covariância ajustada para idade: *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

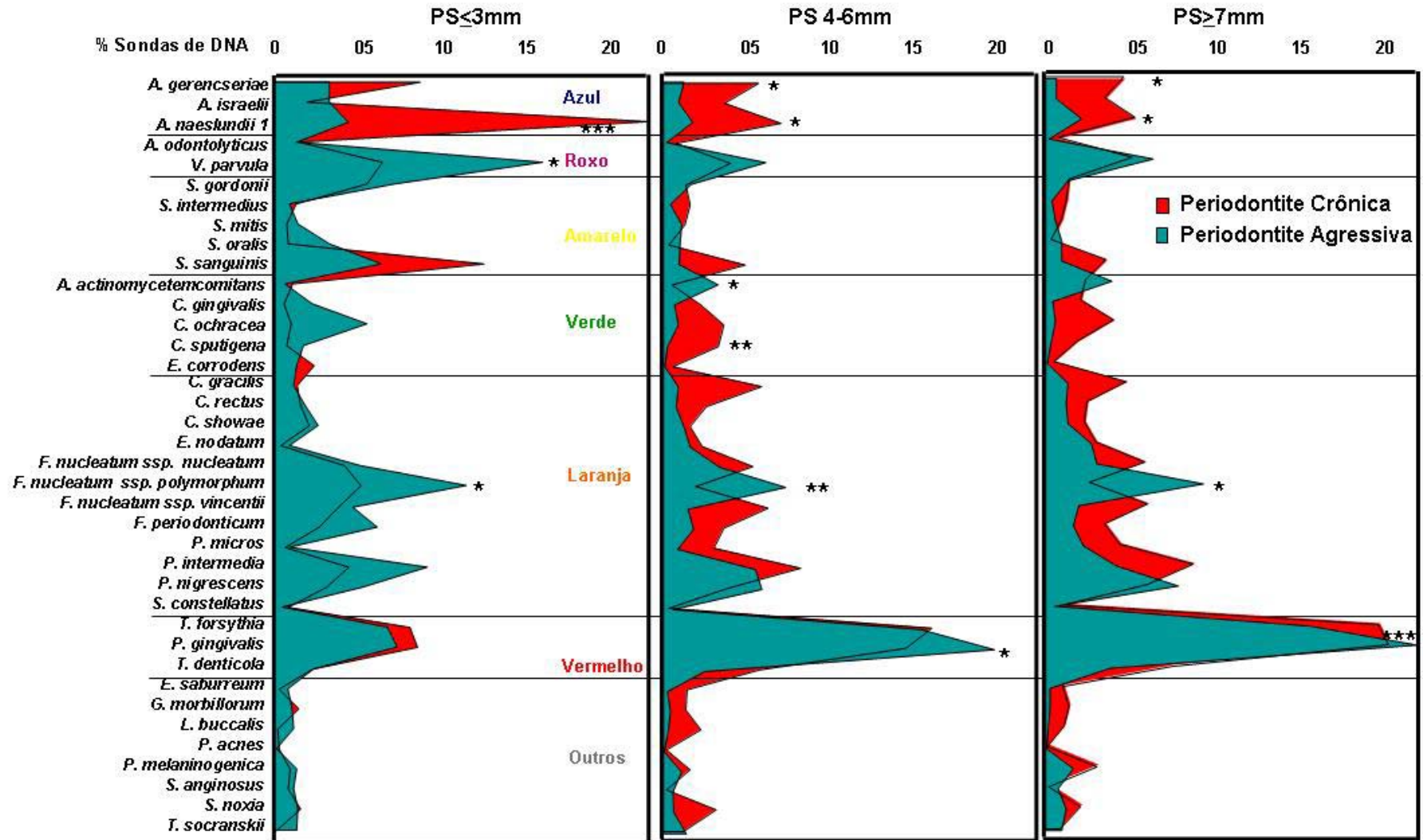


Figura 11. Perfil microbiano das médias de proporção de sondas de DNA das 38 espécies analisadas presentes nas amostras de biofilme subgingival de 30 indivíduos com periodontite crônica e 12 indivíduos com periodontite agressiva generalizada, sendo os sítios separados por categoria de Profundidade à Sondagem-PS: rasos (≤ 3 mm), intermediários (4-6mm), profundos (≥ 7 mm). Análise de covariância ajustada para idade: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a composição microbiana de indivíduos com periodontite crônica (PC) e com periodontite agressiva generalizada (PA), comparando-os com indivíduos periodontalmente saudáveis (S). A idade média significativamente mais alta foi observada no grupo de indivíduos com PC em comparação aos do grupo PA. Visto que esta variável pode estar relacionada à progressão da doença (Salonen *et al.*, 1991), foram realizados ajustes para este fator de confundimento na coleta dos dados microbiológicos.

Nossos resultados indicam que há diferenças quantitativas e qualitativas nos padrões de colonização das 38 espécies avaliadas entre os três grupos clínicos (Figs. 5-8). Foram observadas proporções médias significativamente mais altas de *A. naeslundii 1* e de *S. oralis* no grupo S em comparação com os indivíduos do grupo PC; enquanto *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii1*, *S. sanguinis* e *C. ochraceae* foram encontradas em proporções mais elevadas em indivíduos saudáveis (S) comparados aos do grupo PA (Figs. 5 e 6). Esses achados corroboram estudos anteriores em que essas espécies estavam associadas à saúde periodontal (Colombo *et al.*, 2002; Haffajee & Socransky, 2005; Haffajee *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2004; Socransky & Haffajee, 2005; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a).

Os indivíduos do grupo PC apresentaram contagens bacterianas mais altas, seguidos pelos do grupo PA e pelos indivíduos saudáveis (Fig. 8). Em comparação com indivíduos saudáveis, as contagens médias para 38 e 18 espécies apresentaram-se significativamente mais altas em amostras de placa subgingival de indivíduos dos grupos PC e PA, respectivamente (Figs. 5 e 6). Esses resultados e o número maior de sítios com acúmulo de placa supragingival observado em indivíduos com periodontite crônica (84,73%) comparado a indivíduos com periodontite agressiva generalizada (53,3%) sustentam a hipótese de que essa quantidade de depósitos microbianos na periodontite agressiva é inconsistente com a severidade da doença (AAP, 2000; Lang *et al.*, 1999).

T. forsythia, *P. gingivalis* e *T. denticola* estavam em níveis, proporções e prevalência mais elevados em indivíduos do grupo PC do que nos do grupo S. Dados similares foram reportados por Lopez *et al.* (2004) e Colombo *et al.* (2002), que também utilizaram a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para avaliar 40 espécies subgingivais em 26 chilenos e 25 brasileiros com periodontite crônica,

respectivamente. O fato interessante é que essas duas populações, de brasileiros (Colombo *et al.*, 2002 e o presente estudo) e de chilenos (Lopez *et al.*, 2004), apresentaram proporções e níveis mais elevados destes patógenos em comparação com indivíduos norte-americanos (Haffajee *et al.*, 2004), mexicanos (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a,b) e suecos (Haffajee *et al.*, 2004). Essas divergências podem ser devidas a diferenças na microbiota específica de cada uma das populações destas regiões geográficas, ou podem estar relacionadas ao nível de infecção dos indivíduos incluídos nos vários estudos.

Outras espécies bacterianas também encontradas em grandes quantidades, proporções e prevalências na PC em comparação com indivíduos saudáveis são *C. rectus*, *E. nodatum*, *P. micros*, *P. nigrescens*, *L. buccalis* e *S. noxia* (Fig. 5). A maioria dessas espécies pode ser considerada como possíveis patógenos periodontais e têm sido previamente associadas com a etiologia da doença periodontal (Choi *et al.*, 2000, Darout *et al.*, 2003; Gajardo *et al.*, 2005; Haffajee *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2000, van Winkelhoff *et al.*, 2005). Muitos autores (Dibart *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2005; Socransky *et al.*, 1998; Tanner *et al.*, 1998) têm feito referências sobre a participação da *S. noxia* na etiologia da periodontite crônica. *C. rectus* e *P. micros* foram encontradas em altas proporções em suecos (Haffajee *et al.*, 2004) e a *P. nigrescens*, em chilenos (Lopez *et al.*, 2004), com periodontite crônica. Além disso, recentemente, a *E. nodatum* foi associada com periodontite crônica em norte-americanos com baixos níveis e proporções de *P. gingivalis* e *T. forsythia* (Haffajee *et al.*, 2006) Também é importante enfatizar que as proporções de todas as espécies consideradas benéficas nos complexos roxo, amarelo e verde e as espécies de *Actinomyces* encontraram-se reduzidas no grupo PC em comparação ao grupo S. Esse perfil de colonização foi descrito também para outras populações (Colombo *et al.*, 2002; Haffajee *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2004; Socransky *et al.*, 1998; Ximenez-Fyvie *et al.*, 200a, b).

As espécies encontradas em altos níveis, proporções e prevalência em indivíduos com periodontite agressiva generalizada comparados a indivíduos saudáveis foram *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *E. nodatum* e *P. nigrescens*. *V. parvula* e *F. nucleatum ssp. polymorphum* também foram predominantes nas amostras de placa subgengival em indivíduos com doença agressiva (PA) (Figs. 6 e 10). Outro achado interessante foi a baixa detecção de

três espécies de *Actinomyces* (*A. gerencseriae*, *A. israelii* e *A. naeslundii* 1), em indivíduos do grupo PA comparados com os indivíduos dos grupos S e PC (Figs. 6-8, 10 e 11).

A. actinomycetemcomitans tem sido apontado como um importante agente etiológico da periodontite agressiva localizada em brasileiros (Cortelli *et al.*, 2005; Tinoco *et al.*, 1997) e em outras populações (Lee *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2001; Zambon *et al.*, 1983). No presente estudo, esse microrganismo apresentou-se em taxas elevadas em indivíduos do grupo PA, quando comparados a indivíduos saudáveis (S), no entanto, os valores dessa espécie foram bastante baixos para a doença agressiva generalizada. *A. actinomycetemcomitans* foi uma das espécies encontradas em níveis baixos ($2,4 \times 10^5$), tendo colonizado apenas 5,2% dos sítios e representando somente 4,7% das espécies avaliadas em indivíduos com doença agressiva. Bragd *et al.* (1987) e Rams *et al.* (1997) sugeriram que a *A. actinomycetemcomitans* apresenta uma alta patogenicidade e, portanto, mesmo níveis baixos dessa espécie poderiam ser danosos ao periodonto. Nossos resultados são consistentes com os de outros estudos que reportaram baixas contagens, prevalência e proporções dessa espécie em indivíduos com periodontite agressiva (Gajardo *et al.*, 2005; Kamma *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2000; Rams *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 2003; Timmerman *et al.*, 2001; Trevilatto *et al.*, 2002).

Uma limitação deste estudo é a impossibilidade de discriminar sorotipos diferentes. O reconhecimento de que variedades de *A. actinomycetemcomitans* com alta leucotoxicidade podem estar associadas a formas agressivas da doença (Colombo *et al.*, 2002; Haubek *et al.*, 2002; Holt *et al.*, 1991) sugerem que uma sonda para distinguir tipos clonais virulentos de não-virulentos seria útil no esclarecimento do papel dessas espécies nas diferentes manifestações da doença periodontal.

A colonização intensa de espécies do complexo vermelho e algumas do complexo laranja em indivíduos com PA foi, de certa maneira, inesperada. No entanto, outros pesquisadores têm sugerido que estes patógenos podem ter influência na etiologia da periodontite agressiva (Kamma *et al.*, 1999; Kamma *et al.*, 2004; Kamma *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2003; Loesche *et al.*, 1985; Mullally *et al.*, 2000; Muller & Flores-de-Jacoby, 1985; Takeuchi *et al.*, 2003; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a). *P. gingivalis*, por exemplo, foi encontrada em níveis significativamente altos em indivíduos do grupo PA, mesmo na comparação com o grupo PC (Fig. 7),

especialmente nas categorias de Profundidade à Sondagem intermediárias e profundas (Fig. 11). Hamlet *et al.* (2001) sugere que a *A. actinomycetemcomitans* é capaz de dar início à doença, o aprofundamento das bolsas e a maior anaerobiose favoreceriam o crescimento de outras espécies, como *P. gingivalis*.

Mombelli *et al.* (2002) revisaram sistematicamente 33 estudos transversais e longitudinais que forneciam dados microbiológicos tanto de indivíduos portadores de periodontite agressiva como de periodontite crônica. Os autores concluíram que a presença ou ausência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *C. retus* não poderiam distinguir indivíduos com periodontite crônica ou agressiva. Nosso estudo também detectou as 38 espécies avaliadas em todos os grupos clínicos.

Até onde sabemos, este estudo é o primeiro em que a composição da microbiota gengival de brasileiros com periodontite agressiva generalizada foi mais profundamente examinada. De fato, apenas recentemente, a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foi usada para analisar o perfil da periodontite agressiva numa população de mexicanos (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006b). Os autores compararam a microbiota de 19 pacientes com periodontite agressiva e 39 indivíduos com periodontite crônica e observaram que nem os níveis e proporções nem a prevalência das 40 espécies bacterianas diferiram entre os grupos clínicos estudados. No entanto, nosso estudo detectou algumas diferenças em espécies bacterianas específicas entre os indivíduos dos grupos PA e PC. *P. gingivalis* e *V. parvula* estavam presentes em níveis mais elevados, e *F. nucleatum ssp. polymorphum* foi encontrada em proporções mais altas em todas as categorias de Profundidade à Sondagem no grupo PA em comparação ao grupo PC.

Foram observados também baixos níveis, proporções e prevalência de espécies de *Actinomyces* nos indivíduos com periodontite agressiva comparados aos do grupo PC. Outro achado interessante refere-se ao padrão de colonização observado na categoria de Profundidade à Sondagem profunda entre as duas formas da doença (Figs. 9-11). Indivíduos do grupo PC mostraram uma alteração evidente na microbiota nas profundidades rasas às profundas. Houve um aumento na proporção das três espécies do complexo vermelho e de várias outras espécies do complexo laranja, acompanhado por uma diminuição na proporção de algumas espécies de *Actinomyces* e de outras espécies benéficas. Essa mudança foi bem menos marcante nos indivíduos do grupo PA, em que as únicas alterações

observadas com o aprofundamento das bolsas foram a redução nas proporções de *V. parvula* e um aumento de *A. actinomycetemcomitans* e das três espécies do complexo vermelho. Esses dados sugerem que a infecção no grupo PA parece ser distribuída mais homoganeamente entre os diferentes sítios subgengivais do que nos indivíduos do grupo PC. Os resultados ligeiramente diversos deste estudo e os do estudo de Ximenez-Fyvie *et al.* (2006a) podem ser explicados pelas diferenças na composição da microbiota da população dos dois países, ou mesmo pelas diferentes características clínicas dos indivíduos avaliados. A Profundidade à Sondagem e o Nível Clínico de Inserção médios foram mais baixos na população mexicana (3,9 mm e 3,9 mm, respectivamente) comparados aos brasileiros (4,72 mm e 4,65 mm, respectivamente). Estudos incluindo mais indivíduos poderiam ajudar a esclarecer essas questões.

6. CONCLUSÃO

* A microbiota subgengival de indivíduos brasileiros com periodontite crônica é semelhante a dos indivíduos com periodontite agressiva generalizada, porém difere marcadamente da observada em indivíduos periodontalmente saudáveis.

* Discretas diferenças no perfil geral de colonização foram observadas em relação às duas formas da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *J Periodontol* 1992; 63: 540-47.

American Academy of Periodontology. Parameter on Aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* 2000; 71 (supplement): 867- 869.

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

Armitage, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals Periodontology* 1999; 4: 1- 6.

Beltrami M, Bickel M, Baehni PC. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1987; 14: 161-4.

Bragd L., Dahlen G, Wikstrom M, Slots J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin Periodontol* 1987; 14:95-99.

Bretz WA, Loesche WJ. Characteristics of trypsin-like activity in subgingival plaque samples. *J Dent Res* 1987;66: 1668-72.

Choi BK, Park SH, Yoo YJ, Choi SH, Chai JK, Cho KS *et al.* Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. *J Periodontol* 2000; 71: 1387-1394.

Christersson LA, Slots J, Zambon JJ, Genco RJ. Transmission and colonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. *J Periodontol.* 1985; 56: 127-31.

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: 360-369.

Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy VI. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 7: 183-8.

Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon J.J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 860-866.

Costerton JW, Cook G, Lamont R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: Newman HN, Wilson M. *Dental Plaque Revisited: oral biofilms in health and disease.* Cardiff: Bioline 1999; 5-14

Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent Jr. RL, Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal disease: 12-month results. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 30-6.

Dahan M, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U. The effect of periodontal treatment on the salivary bacterial load and early plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 972-7

Darout IA, Skaug N, Albandar JM. Subgingival microbiota levels and their associations with periodontal status at the sampled sites in an adult Sudanese population using miswak or toothbrush regularly. *Acta Odontol Scand.* 2003; 61: 115-122.

Dibart S, Chapple IL, Skobe Z, Shusterman S, Nedleman HL. Microbiological findings in prepubertal periodontitis. A case report. *J Periodontol* 1998; 69: 1172-1175.

Faveri M, Feres M, Shibli JA, Hayacibara RF, Hayacibara MM, de Figueiredo LC. Microbiota of the Dorsum of the Tongue After Plaque Accumulation: An Experimental Study in Humans. *J Periodontol* 2006; 77(9): 1539-1546.

Feinberg AP & Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 1983; 132: 6-13.

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, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard KA, Som S, Smith C. 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, Gonçalves C, Allard K, Som S, Smith C, Goodson M, 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.

Furuichi Y, Ramberg P, Krok L, Lindhe J. Short-term effects of triclosan on healing following subgingival scaling. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 777-82.

Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras *et al*. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol*. 2005; 76: 289-94

Haffajee AD & Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000* 2005; 38: 9-12.

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; 31: 996-1002.

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* 1997b; 24: 767-76.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1997a; 24: 324-34.

Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL, Smith DJ. Clinical, microbiological and immunological features associated with the treatment of active periodontosis lesions. *J Clin Periodontol*. 1984; 11: 600-18.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 1994; 5: 78-111.

Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21: 269-82.

Hamlet SM, Cullinan MP, Westerman B, Lindeman M, Bird PS, Palmer J, *et al* Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 1163-1171.

Han N, Xiao X, Zhang L *et al*. Bacteriological study of juvenile periodontitis in China. *J Periodont Res* 1991; 26: 409-414.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 2001; 80: 1580-3

Haubek D, Ennibi OK, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2002; 29:657-660.

Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2: 177-281.

Ishikawa I, Kawashima Y, Oda S, Iwata T, Arakawa S. Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. *J Periodontal Res*. 2002; 37: 324-32.

Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J Periodontal Res*. 1999; 34: 25-33.

Kamma JJ, Nakou M, Manti FA.. Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontal Res*. 1995; 30: 66-72.

Kamma JJ, Nakou M, Persson RG. Association of early onset periodontitis microbiota with aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 1096-1105.

Kamma JJ, Contreras A, Slots J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 879-885.

Kamma JJ, Nakou M, Gmur R, Baehni P.C. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiology and Oral Immunology* 2004; 19: 314-21.

Kazor CE, Mitchell AM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE *et al.* Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 558-563.

Lang NK. Consensus reports: aggressive periodontitis *Ann Periodontol.* 1999; 4 (1):53

Lee JW, Choi BK, Yoo YJ, Choi SH, Cho KS, Chai JK, *et al.* Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74: 1329-35.

Lie MA, Danser MM, van der Weijden GA, Timmerman MF, de Graaf J, van der Velden U. Oral microbiota in subjects with a weak or strong response in experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 642-47.

Listgarten MA, Lindhe J, Helldén L. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1978; 5: 246-71.

Listgarten MA. Electron microscopic observations of the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 1965; 36: 328-39.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 431-45

Löe H, Anerud H, Boysen H, Smith M. The natural history periodontal disease in man: the rate of periodontal destruction before 40 years of age. *J Periodontol* 1978; 49: 177-187.

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

Löe H. The gingival index, the plaque index, and the retention index systems. J Periodontol 1967; 38:610-6.

Loesche W, Bretz WA, Kerchensteiner D, Stoll J, Socransky SS, Hujoel P *et al.* Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of Benzoyl-DL-Arginine-Naphthylamide. J Clin. Microbiol 1990; 28: 1551-59.

Loesche W, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J Periodontol 1985; 56(8): 447-56.

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

Lopez NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. J Periodontol 2000; 71:948-954.

Lopez NJ, Mellado JC, Leighton GX. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. J Clin Periodontol 1996; 23: 101-5.

Lopez NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. J Periodontol 2004; 75: 717-725.

Lovdal A, Arno A, Waerhaug J. Evidence of clinical manifestations of periodontal disease in light of oral hygiene and calculus formation. J Am Dent Assoc. 1958; 56: 21-33.

Mandell RL, Ebersole JL, Socransky SS. Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. J Clin Periodontol. 1987; 14: 534-40.

Mandell RI, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. J Periodontol 1981; 52: 593.

Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Loe H. Oral health of United States adults. The National Survey of Oral Health in U.S. employed adults and seniors: 1985-1986 national findings. NIH Publication no.87-2868. Bethesda, MD:NIDR, 1987.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. J Clin Periodontol. 2002, 29 (Suppl 3):10-21.

Moore WEC, Moore LH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 42(3): 127-38.

Mullally, Dace B, Shelburne CE, Wolf LF, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early onset periodontitis. J Periodontol Res 2000; 35: 232-241.

Muller HP, Flores-de-Jacoby, L. The composition of the subgingival microflora of young adults suffering from juvenile periodontitis. J Clin Periodontol 1985; 12: 113-123.

Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. J Periodontal Res. 1977; 12: 120-8.

Norskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen nov comb nov *Aggregatibacter aphrophilus* comb nov and *Aggregatibacter segnis* comb nov and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor independent isolates. International J Sys Evol of Microbiol 2006; 56: 2135-2146.

Omar AA, Newman HN, Bulman J, Osborn J. Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket. J Clin Periodontol. 1990; 17: 364-70

Paster BJ, S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst. . Bacterial diversity in human subgingival plaque. J. Bacteriol 2001; 183: 3770-3783.

Pennel BM, Keagle JG. Predisposing factors in the etiology of chronic inflammatory periodontal disease. J Periodontol 1977; 48: 517-32.

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* 1997; 23: 346-354.

Russel AL. Epidemiology of periodontal disease. *Int Dent J*. 1967; 17: 282-296.

Russo PA, Nowzari H, Slots J. Transmission and persistence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in twins with advanced periodontitis. *J Calif Dent Assoc* 1998; 26: 290-4.

Salonen LW, Frithiof L, Wouters FR, Hellden LB. Marginal alveolar bone height in an adult Swedish population. A radiographic cross-sectional epidemiologic study. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 223-232.

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.

Schei O, Waehaugh J, Lovdal A, Aron A. Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J Periodontol* 1959; 30: 7-16.

Schenkein HA, Burmeister JA, Koertge TE *et al*. The influence of race and gender on periodontal flora. *J Periodontol* 1993; 54: 292-296.

Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in advanced periodontitis in man. *Dtsch Zahnarztl Z*. 1984;39: 615-22

Slots J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res*. 1976; 84: 1-10.

Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun* 1980; 29: 1013.

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, Cugini M A, Smith C & Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998; 25: 134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000 2005; 38: 135-87.

Socransky SS. Microbiology of periodontal disease- present status and future considerations. J Periodontol 1977; 48: 497-504.

Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res 1970; 49: 203-22.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. Periodontol 2000 1994; 5: 7-25.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 2002; 28:12-55.

Takeuchi Y, Umeda M, Ishizura M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. J Periodontol 2003; 74:1060-9.

Tan KS, Woo CH, Ong G, Song KP. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. J Clin Periodontol 2001; 28:886-890.

Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. J Clin Periodontol 1998; 25: 85-98.

Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. J Clin Periodontol 1986; 13: 905-11.

Theilade EW, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J Periodontol Res. 1966; 1: 1-13.

Timmerman MF, Van der Weijden GA, Arief EM, Armand S, Abbas F, Winkel EG, *et al.* Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. J Clin Periodontol. 2001; 28: 617-27

Tinoco EM, Lyngstadaas SP, Preus HR, Gjermo P. Attachment loss and serum antibody levels against autologous and reference strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in untreated localized juvenile periodontitis patients. J Clin Periodontol 1997; 24: 937-944.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. Annals of Periodontology 1999; 4:39-53

Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Goncalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. J Clin Periodontol 2002, 29:233-9.

van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. J Clin Periodontol 2005; 32:893- 898.

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

Ximenez-Fyvie, L.A., Almaguer-Flores, A., Jacobo-Soto, V., Lara-Cordoba, M., Sanchez-Vargas, L.O., Alcantara-Maruri, E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2006a; 33:869- 377.

Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. J Periodontol 2006b; 77:460-471.

Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. Eur J Oral Sci. 2005; 113:28-33.

Zambon JJ, Chisterson LA, Slots J. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J Periodontol 1983; 54: 707-11.

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol 1985; 12: 1-20.

ANEXOS

- Anexo A: Exame periodontal
- Anexo B: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANEXO B



Guarulhos, 05 de dezembro de 2005.

Exmo. Sr.
Prof. Marcelos de Faveri

PARECER Nº 36/2005

Referência: **Aprovação de Projeto**
SISNEP/104 - "Doença periodontal agressiva: estudo clínico, microbiológico e imunológico"

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Doença periodontal agressiva: estudo clínico, microbiológico e imunológico" - SISNEP/104, na reunião de 05.12.2005, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**.

As orientações abaixo devem ser consideradas pelo Pesquisador Responsável durante a realização da pesquisa, visando que a mesma se desenvolva respeitando os padrões éticos:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclarecemos a necessidade da apresentação de relatório de andamento até **30.06.2006** e relatório final até **31.01.2007**.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luciene Cristina de Figueiredo'.

Luciene Cristina de Figueiredo
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa