



MESTRADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA

LETÍCIA DE LORENZO ABREU

**REDEFINIÇÃO DO DIAGNÓSTICO PERIODONTAL (CLÍNICO E  
MICROBIOLÓGICO) DE ACORDO COM A NOVA CLASSIFICAÇÃO DAS  
DOENÇAS PERIODONTAIS EM INDIVÍDUOS SISTEMICAMENTE SAUDÁVEIS**

Guarulhos

2020

LETÍCIA DE LORENZO ABREU

**REDEFINIÇÃO DO DIAGNÓSTICO PERIODONTAL (CLÍNICO E  
MICROBIOLÓGICO) DE ACORDO COM A NOVA CLASSIFICAÇÃO DAS  
DOENÇAS PERIODONTAIS EM INDIVÍDUOS SISTEMICAMENTE SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada à Universidade  
Univeritas UNG para a obtenção do título de  
Mestre em Odontologia. Área de concentração:  
Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciene C. Figueiredo

Co-orientador: Prof. Hélio Doyle P. da Silva

Guarulhos

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca**

A162r

Abreu, Letícia de Lorenzo

Redefinição do diagnóstico periodontal (clínico e microbiológico) de acordo com a nova classificação das doenças periodontais em indivíduos sistemicamente saudáveis. / Letícia de Lorenzo Abreu. -- 2020.

45 f.; 31 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciene C. Figueiredo

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2020.

1. Doença periodontal 2. Diagnóstico 3. Classificação 4. Estágio 5. Grau I. Título II. Figueiredo, Luciene C (Orientadora). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6



Grupo Ser Educacional



Construindo o futuro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "REDEFINIÇÃO DO DIAGNÓSTICO PERIODONTAL (CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO) DE ACORDO COM A NOVA CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS PERIODONTAIS EM INDIVÍDUOS SISTEMICAMENTE SAUDÁVEIS" em sessão pública realizada em 30 de setembro de 2020, considerou a candidata LETÍCIA DE LORENZO ABREU aprovada.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo (UNG) *Luciene Cristina de Figueiredo*

2. Profa. Dra. Stella de Noronha Campos Mendes (UFPI) *Stella de Noronha Campos Mendes*

3. Profa. Dra. Tamires Szeremeske de Miranda (UNG) *Tamires Szeremeske de Miranda*

Guarulhos, 30 de setembro de 2020.

Dedico este trabalho inteiramente à minha família que, apesar de segurarem minhas mãos em todos os momentos, me ensinaram a caminhar sozinha em direção de cada sonho com muita fé. Obrigada por me educarem, encorajarem e fazerem parte disso, que acaba de se tornar realidade!

## AGRADECIMENTOS

Edson, meu pai, foi alguém que me ensinou, com seu exemplo, que eu devia dar sempre o melhor de mim em tudo que eu fizesse, em qualquer situação. Levo em minha memória todos os momentos em que estive ao seu lado, os beijos e abraços, os passeios e cada conselho que me deu antes de seguir sua jornada ao lado de Deus.

Cida, minha mãe, é exemplo de força, de determinação e de coragem, que tem em seu colo um refúgio seguro sempre. A pessoa que me acalma, que reforça a confiança que devo ter em mim mesma quando as coisas não vão muito bem e me apoia em tudo. A união da força de minha mãe e do fazer sempre o melhor do meu pai formaram o que sou hoje, alguém que tenta colocar o coração por completo em tudo o que faz.

Agradeço imensamente à Deus pela presença diária de minha Avó, Carmem, desde que nasci. Obrigada por todo esforço, cuidado e preocupação... Por cada lanchinho, almoço e janta que sempre estavam prontos quando eu chegava da escola, nos quatro anos da faculdade e durante todo o mestrado. É uma benção poder cuidar de você agora e retribuir pelo menos um pouquinho de tudo o que fez por mim.

Aos meus padrinhos, Nei e Fátima, minha eterna gratidão por cuidarem de mim como se fosse filha. Obrigada por toda a ajuda financeira que possibilitou a entrada na faculdade de odontologia, por estarem sempre presentes, por se preocuparem tanto com meus estudos, saúde... Por me darem o apoio e todo o carinho que há dentro do coração de vocês!

Jéssica e Larissa, vocês têm noção de quão abençoadas somos por termos umas às outras? Só Deus explica nossa sintonia! Minha irmã mais nova e minha irmã mais velha são os maiores exemplos que tenho comigo. Sempre foram decididas, independentes e corajosas... Eu, ainda estou aprendendo com elas! Muito obrigada por estarem sempre de braços abertos, por me ajudarem e me ensinarem tanto... Obrigada por existirem!!!

À minha orientadora, Luciene Figueiredo, eu não teria uma palavra melhor para dizer, a não ser, Obrigada! Durante esse tempo na universidade, escutei diversas vezes que temos muitas semelhanças com o professor que nos orienta, então me sinto muito sortuda por isso. Não teve um dia durante esses dois anos que eu não tenha me inspirado e aprendido algo novo com você. Seja em relação à odontologia, as minhas responsabilidades, em relação a vida, a valores e princípios.

Professora Tamires Szeremeske, muito obrigada por me encorajar e ajudar em todos os momentos desde a iniciação científica até a finalização do mestrado, no laboratório, nas clínicas, nos relatórios, congressos e apresentações.

Gostaria de agradecer a todos os meus professores, pelos ensinamentos, pela paciência e por todo o carinho! E, por fim, agradecer aos pacientes que pude ajudar durante todo esse tempo e que contribuíram imensamente para o meu aprendizado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio ao Programa de Pós-graduação da Universidade Univeritas UNG e pela concessão da bolsa de estudos.

"Aqueles que estão apaixonados pela prática sem a ciência são iguais ao piloto que navega sem leme ou bússola e nunca tem certeza para onde vai. A prática deve estar sempre baseada em um perfeito conhecimento da teoria".

Leonardo da Vinci



## RESUMO

De acordo com a nova classificação das doenças periodontais proposta, recentemente, pela Academia Americana de Periodontia (AAP) e pela Federação Europeia de Periodontia (EFP), as formas de doenças antes definidas como Periodontite Crônica e Periodontite Agressiva são chamadas agora apenas de Periodontites, caracterizadas como uma única doença. Atualmente, a periodontite deve ser classificada em estágio (I a IV) e grau (A, B e C). O propósito deste estudo retrospectivo foi redefinir o diagnóstico clínico periodontal, de acordo com a nova classificação das doenças periodontais, dos indivíduos sistemicamente saudáveis já atendidos no Centro de Estudos Clínicos da Pós-graduação em Odontologia da Universidade Guarulhos. O objetivo secundário foi avaliar o perfil microbiológico dos indivíduos aderidos à cada novo perfil clínico. Para tal finalidade, à partir do banco de dados dos estudos clínicos realizados entre 2004 até 2019, as informações de 354 indivíduos foram aleatoriamente selecionadas para reclassificação em estágio, grau e perfil microbiológico. A análise estatística foi realizada por meio dos testes Kruskal-Wallis (ANOVA post hoc) e Dunn. Os resultados demonstraram que os dados dos indivíduos inseridos no banco de dados caracterizaram os perfis periodontais de Estágio III (Grau B e Grau C) e Estágio IV (Grau B e Grau C). A principal diferença no perfil microbiológico foram os maiores níveis e percentuais das espécies do complexo vermelho nos indivíduos do Grupo IV. Concluiu-se que as diferenças clínicas categorizados em Estágios III ou IV (graus B ou C) são suportadas por diferenças microbiológicas especialmente relacionadas aos níveis e proporções das espécies bacterianas do complexo vermelho.

**Palavras-chave:** Doença periodontal; Diagnóstico; Classificação; Estágio; Grau.

## ABSTRACT

According to the new classification of periodontal diseases recently proposed by the American Academy of Periodontics (AAP) and the European Federation of Periodontics (EFP), the forms of diseases previously defined as Chronic Periodontitis and Aggressive Periodontitis are now only called as Periodontitis, characterized as a single disease. Currently, periodontitis should be classified into stage (I to IV) and grade (A, B and C). The purpose of this retrospective study was to redefine periodontal clinical diagnosis, according to the new classification of periodontal diseases, of systemically healthy individuals already attended at the Center for Clinical Studies of the Graduate School of Dentistry at Universidade Guarulhos. The secondary objective was to assess the microbiological profile of individuals adhering to each new clinical profile. For this purpose, from the database of clinical studies carried out between 2004 and 2019, the information of 354 individuals was randomly selected for reclassification in stage, grade and microbiological profile. The statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis (ANOVA post hoc) and Dunn tests. The results showed that the data of the individuals inserted in the database characterized the periodontal profiles of Stage III (Grade B and Grade C) and Stage IV (Grade B and Grade C). The main difference in the microbiological profile was the higher levels and percentages of species of the red complex in individuals in Group IV. It was concluded that the clinical differences categorized in Stages III or IV (grades B or C) are supported by microbiological differences especially related to the levels and proportions of the bacterial species of the red complex.

**Keywords:** Periodontal disease; Diagnosis; Classification; Stage; Grade.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação gráfica do Minislot 30 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras na membrana de nylon (técnica Checkerboard DNA-DNA hybridization). 26
- Figura 2** Representação gráfica do Miniblotter 45 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras (técnica checkerboard DNA-DNA hybridization). 27
- Figura 3** Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras e as sondas de DNA (técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization*). 28
- Figura 4** Média das proporções dos complexos microbianos (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY; HAFFAJEE et al., 2002) nos grupos de indivíduos categorizados em Estágio III (Graus B e C) e Estágio IV (Graus B e C). 34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002).	24
<b>Tabela 2</b>	Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme.	29
<b>Tabela 3</b>	Características epidemiológicas e médias dos parâmetros clínicos periodontais ( $\pm$ desvio padrão) da população do estudo, no exame inicial.	33

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>13</b>
1.1 Etiologia das doenças periodontais.....	14
1.2 Classificação das doenças periodontais.....	16
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Materiais e métodos.....</b>	<b>21</b>
3.1 Delineamento do estudo.....	21
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	21
3.3 Avaliação clínica anteriormente realizada.....	22
3.4 Avaliação microbiológica anteriormente realizada.....	23
3.4.1 Seleção das espécies bacterianas avaliadas e condições de crescimento.....	23
3.4.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas.....	25
3.4.3 Checkerboard DNA-DNA hybridization.....	25
3.4.4 Detecção das espécies.....	27
3.5 Classificação atual das doenças periodontais.....	29
3.6 Análise dos Dados.....	30
<b>4. Resultados.....</b>	<b>32</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>35</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>39</b>
<b>Referências.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecto-inflamatória que leva à destruição dos tecidos periodontais de proteção e sustentação, podendo causar a perda do elemento dentário (SOCRANSKY & HAFFAJEE 2005). Esta definição se dá por conta do envolvimento microbiológico e imunológico, ou seja, é a interação disbiótica entre espécies de bactérias patogênicas na cavidade oral e a resposta do hospedeiro frente a essa agressão, que geram um ambiente propício para desencadeamento da doença, afetando o progresso e a resposta tecidual da terapia periodontal (FERES et al., 2004).

As doenças periodontais podem ser vistas em até 90% da população global, tornando-se a doença bucal mais comum. Elas surgem como resultado de vários fatores, incluindo fatores de risco específicos do paciente e higiene oral inadequada (GASNER et al., 2020). Por esse motivo, o termo medicina periodontal foi empregado, com o intuito de entender os fatores de risco relacionados a periodontite, como o tabagismo e os comprometimentos sistêmicos, como diabetes mellitus, que podem interferir no desencadeamento, na gravidade da doença e cicatrização dos tecidos após tratamento.

Os conhecimentos obtidos a partir dos resultados de estudos clínicos, vem auxiliando o melhor entendimento da etiopatogênese da doença periodontal. Esses conhecimentos só fazem sentido se embasarem os procedimentos realizados pelo cirurgião-dentista durante o atendimento de pacientes. Na Periodontia, um exemplo da transferência desses conhecimentos científicos para uma aplicação prática, é a definição do diagnóstico clínico periodontal, por meio da classificação das doenças periodontais, permitindo uma linguagem comum entre os profissionais.

Ao longo dos anos a classificação periodontal passou por diversas mudanças. Uma classificação não deve ser considerada como algo permanente. Deve ser adaptável para mudar e evoluir com o desenvolvimento de novos conhecimentos (HIGHFIELD 2009).

Até 2017, as periodontites eram classificadas em duas formas principais: “periodontite crônica” e “periodontite agressiva” (ARMITAGE 1999). Nas últimas duas décadas, clínicos, educadores, pesquisadores e epidemiologistas manifestaram preocupação com a capacidade de diferenciar corretamente os casos de periodontite agressiva e crônica. Essa dificuldade foi a principal justificativa para o novo workshop de classificação, já que, atualmente, não há evidências suficientes para considerar a periodontite agressiva e crônica

como duas doenças fisiopatologicamente distintas (TONETTI et al., 2018), e que, portanto, exista apenas uma periodontite com diferentes expressões clínicas em diferentes hospedeiros.

A Academia Americana de Periodontia (AAP) e a Federação Europeia de Periodontia (EFP) redefiniram os antigos conceitos para "periodontites", como uma única doença, devendo ser classificada em estágios e grau (PAPAPANOU et al., 2018; TONETTI et al., 2018).

Por tratar-se de uma alteração recente, até o momento existe pouca informação na literatura sobre estudos publicados envolvendo este assunto tão relevante para a área específica do conhecimento, por isso a importância de novas evidências que possam ser implementadas na prática clínica, pesquisa e vigilância epidemiológica.

A execução do novo esquema de classificação para doenças periodontais dá uma visão da etiologia, patologia e patogênese das doenças periodontais, que é benéfico para os pacientes e, também, traz diferenças significativas nas estimativas de prevalência de periodontite, assim como estrutura para futuros trabalhos de pesquisa em odontologia (MISHRA et al., 2019).

Atualmente, no Brasil, o grupo de pesquisa do CNPq "Pesquisa Periodontal Avançada", vinculado ao programa de pós-graduação em Odontologia da UNG possui um dos maiores banco de dados clínicos e microbiológicos provenientes da realização de estudos clínicos randomizados controlados em indivíduos sistemicamente saudáveis ou com algum comprometimento na saúde geral. Dessa forma, a realização deste estudo a partir da redefinição do diagnóstico clínico periodontal, de acordo com a nova classificação, e sua associação com o perfil microbiológico trará informações epidemiológicas importantes para a comunidade científica desta área do conhecimento.

### **1.1 Etiologia das doenças periodontais**

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias, de característica multifatorial, que acometem os tecidos de suporte e sustentação dos dentes. Os casos mais severos, caracterizam-se pela perda de inserção do ligamento periodontal e destruição dos tecidos ósseos adjacentes. A evolução deste processo leva à perda dos dentes, pois a destruição causada pela ação das bactérias periodontopatogênicas, acúmulo de cálculo supragengival e subgengival e inflamação destas estruturas colaboram para a formação de bolsas periodontais que levam à mobilidade dentária.

A gravidade do ataque e da destruição varia de um indivíduo para outro, dependendo da virulência do biofilme e da eficiência da resposta imune inflamatória local e

sistêmica do indivíduo (MANN et al., 2020). Cada vez mais, evidências mostram que a doença periodontal está associada a vários problemas de saúde sistêmicos, que interferem diretamente no curso da periodontite.

Os microrganismos responsáveis pela inflamação dos tecidos periodontais podem se alojar em língua, mucosa oral, tonsilas, saliva e regiões de furcas, servindo como fonte de reservatórios desses patógenos para uma recontaminação de sítios já tratados (TELES et al., 2008).

Atualmente estima-se que aproximadamente 700 espécies bacterianas habitem a cavidade bucal. A maioria parece ser comensal e apenas um pequeno número compreende patógenos oportunistas (KAZOR, 2003). A maioria dos patógenos residentes são nativos da cavidade oral, mas podem causar superinfecções e habitar em bolsas periodontais. Segundo Slots (1999) para ser reconhecido como periodontopatógeno, o microrganismo deve apresentar os seguintes requisitos:

- Associação com sítios de destruição ativa em maior número e mais frequente do que nos sítios saudáveis ou nos inativos.
- A eliminação dos patógenos por medidas terapêuticas deve ser acompanhada de cura ou remissão da doença.
- Resposta imunitária por parte do hospedeiro contra o microrganismo e seus produtos.
- Elaboração de fatores demonstráveis de virulência.

A associação das bactérias no interior de biofilmes mistos não é aleatória; ao contrário, existem associações específicas entre as espécies bacterianas. SOCRANSKY et al. (1998) observaram a relação entre 40 espécies bacterianas presentes em 13.261 amostras de biofilme subgingival de 185 indivíduos (160 com doença periodontal crônica e 25 saudáveis) por meio do método *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. A partir das análises, as espécies foram agrupadas em cinco complexos bacterianos principais: vermelho, laranja, amarelo, verde e roxo. Entre estes, apenas as bactérias dos complexos vermelho e laranja são consideradas importantes patógenos envolvidos com a progressão da doença periodontal. O complexo vermelho, constituído pelas espécies *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. O complexo laranja, que parece preceder a colonização do complexo vermelho, foi dividido em 2 subgrupos: um central, constituído por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*; e outro grupo periférico, formado por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilli* e *Streptococcus constellatus*. Os outros três



complexos, denominados amarelo, verde e roxo demonstraram grande associação entre si e menor associação com os dois primeiros, e são compostos por diversas espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro. O complexo verde, composto por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a. O complexo amarelo é formado por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*. E, ainda, o complexo roxo, que inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As espécies de *Selenomonas noxia* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b não se correlacionaram com outras espécies. Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* 1, *Actinomyces oris*) foram agrupadas em mais um complexo (SOCRANSKY E HAFFAJEE, 2002). Também examinaram 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, com as espécies do complexo laranja.

## 1.2 Classificação das doenças periodontais

Até 2017, a classificação utilizada tinha sido proposta em 1999, pela Academia Americana de Periodontia (AAP), onde a periodontite estava dividida em agressiva ou crônica, conforme sua progressão. A periodontite crônica estava associada a indivíduos maiores que 30 anos de idade, com perda óssea compatíveis com a quantidade de fator etiológico, sendo de progressão lenta, podendo ser severa, moderada ou leve, e de acordo com a localização, localizada ou generalizada. Já a periodontite agressiva, qualificava pacientes jovens com menos de 30 anos que apresentavam rápida progressão da doença, associados a pouca quantidade de biofilme, podendo ser localizada, quando atingia somente incisivos e molares, e generalizada, quando além dos incisivos e molares, mais 3 dentes estavam acometidos pela doença (ARMITAGE, 1999).

Aproximadamente após vinte anos, membros da AAP e da Federação Europeia de Periodontia (EFP) se reuniram em um consenso com objetivo de discutir pontos não resolvidos pela classificação anterior. Durante o consenso estabeleceu-se uma nova classificação das periodontites considerando o estadiamento e graduação (PAPAPANOU et al., 2018; TONETTI et al., 2018), sendo assim, ficou estabelecido como periodontite ambas as formas da doença anteriormente conhecidas como “crônica” e “agressiva” (CATON et al., 2018).

De acordo com a nova classificação, após a definição de um caso como periodontite deve-se estabelecer o estadiamento da doença. Este critério tem sido usado há muitos anos em oncologia, pois não se baseia apenas na destruição passada de maneira isolada, mas permite uma classificação futura (TONETTI et al., 2018). O estágio I a IV da periodontite é definido com base na gravidade, complexidade do caso (profundidade de bolsa, defeitos intraósseos, envolvimento de furca, mobilidade dentária, disfunção mastigatória) e pode mudar o estágio para um nível mais elevado, e adicionalmente estabelecer a extensão (localizada ou generalizada). Após o estadiamento, define-se o grau, um indicador da taxa de progressão da doença. O grau de periodontite é estimado com evidência direta ou indireta da taxa de progressão em três categorias: progressão lenta, moderada e rápida (Grau A, B e C). Inicialmente, utiliza-se o critério primário, pois sempre que disponível a evidência direta deve ser usada; na sua ausência uma estimativa indireta é feita entre a porcentagem da perda óssea radiográfica do dente mais afetado com a idade do paciente (perda óssea radiográfica/idade). Deve-se assumir inicialmente o grau B e procurar evidências específicas, se disponível, para alteração do grau em A ou C.

Uma grande mudança na nova classificação foi a inclusão dos fatores de risco como modificadores de grau (PAPAPANOU et al., 2018; TONETTI et al., 2018), uma vez que estudos clínicos e epidemiológicos realizados em diferentes populações são unânimes em demonstrar maior prevalência, gravidade e progressão de periodontite em fumantes e diabéticos (LINDEN et al. 1994, HEITZ-MAYFIELD 2005, VOUIROS et al. 2011, LÖE 1993, TAYLOR et al. 1998, NOVAK et al. 2008, KAUR et al. 2009, PRESHAW et al. 2010). Tanto tabagismo quanto o DM são grandes problemas de saúde mundial, devido as complicações sistêmicas geradas.

### **A) Estágios**

*Estágio I – periodontite inicial.*

- Severidade: Perda de inserção clínica interdental no sítio de maior perda igual a 1-2 mm; Perda óssea radiográfica: abrange somente o terço coronal (<15%); Perda dentária: não há risco de perda dentária.

- Complexidade (sítio): Profundidade de sondagem máxima  $\leq 4$  mm, e quase inteiramente perda óssea horizontal.

*Estágio II – periodontite moderada.*

- Severidade: Perda de inserção clínica interdental no sítio de maior perda igual a 3-4 mm; Perda óssea radiográfica: abrange somente o terço coronal (15% a 30%); Perda dentária: não há risco de perda dentária.

- Complexidade (sítio): Profundidade de sondagem máxima  $\leq 5$  mm, e quase inteiramente perda óssea horizontal.

*Estágio III – periodontite severa com potencial para perda dentária.*

- Severidade: Perda de inserção clínica interdental no sítio de maior perda  $\geq 5$  mm; Perda óssea radiográfica: Se estende ao terço médio ou apical da raiz; Perda dentária: Perda dentária de  $\leq 4$  dentes devido à periodontite.

- Complexidade (sítio): Profundidade de sondagem  $\geq 6$  mm; perda óssea vertical de  $\geq 3$  mm; envolvimento de furca de grau II ou III; defeito de rebordo moderado.

*Estágio IV – periodontite severa com perda dentária extensa e potencial para a perda da dentição.*

- Severidade: Perda de inserção clínica interdental no sítio de maior perda  $\geq 5$  mm; Perda óssea radiográfica: Se estende ao terço médio ou apical da raiz; Perda dentária: Perda dentária de  $\geq 5$  dentes devido à periodontite.

- Complexidade (sítio): Em adição à complexidade do estágio III; Necessidade de reabilitação complexa devido a: disfunção mastigatória; defeito de rebordo grave; colapso de mordida, espaçamento de mordida; menos de 20 dentes remanescentes (10 pares de antagonistas).

**Extensão e distribuição:** *Localizada:*  $< 30\%$  dos dentes envolvidos; *Generalizada:*  $> 30\%$  dos dentes envolvidos e *Padrão molar/ incisivo:* envolvimento dos dentes incisivos e molares.

## **B) Grau**

### *Critério primário*

\* Evidências diretas (dados longitudinais, quando existe acompanhamento do paciente – perda óssea radiográfica ou perda de inserção clínica)

*Grau A:* evidência de perda ao longo de 5 anos; *Grau B:*  $< 2$ mm ao longo de 5 anos; *Grau C:*  $\geq 2$ mm ao longo de 5 anos.

\* Evidências indiretas (quando não se tem acompanhamento do paciente, é usado a perda óssea em função da idade na apresentação do dente ou caso mais afetado – perda óssea radiográfica expressa como porcentagem do comprimento da raiz dividida pela idade do indivíduo)

*Grau A:* <0,25, Muito acúmulo de biofilme e baixos níveis de destruição; *Grau B:* 0,25 a 1,0, Destruição proporcional com os depósitos de biofilme; *Grau C:* >1,0, Destruição excede o esperado devido ao biofilme: padrões clínicos específicos sugestivos de períodos de progressão rápida e/ou estabelecimento precoce da doença (exemplo: padrão molar/incisivo).

*Modificadores de Grau (presença de fatores de risco)*

Deve-se inicialmente assumir o grau B e buscar evidências específicas para mudar para o C ou continuar no B.

- Diabéticos com hemoglobina glicada (HbA1c) < 7,0 mg/dL = Grau B
- Diabéticos com hemoglobina glicada (HbA1c)  $\geq$  7,0 mg/dL = Grau C
- Fumantes que consomem menos que 10 cigarros/dia = Grau B
- Fumantes que consomem 10 ou mais cigarros/dia = Grau C

## **2 OBJETIVO**

O objetivo principal deste estudo retrospectivo foi redefinir o diagnóstico clínico periodontal, de acordo com a nova classificação das doenças periodontais, dos indivíduos sistemicamente saudáveis já atendidos no Centro de Estudos Clínicos da Pós-graduação em Odontologia da Universidade Guarulhos. O objetivo secundário foi avaliar o perfil microbiológico dos indivíduos aderidos à cada novo perfil clínico.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Delineamento do estudo

Neste estudo retrospectivo, a partir do banco de dados dos estudos clínicos realizados entre 2004 até 2019, as informações de 354 indivíduos foram aleatoriamente selecionadas para reclassificação de acordo com a nova classificação das doenças periodontais, em estágio e grau, além do perfil microbiológico das espécies bacterianas envolvidas na etiologia das doenças periodontais.

Este projeto não foi submetido ao Comitê de Ética via Plataforma Brasil, pois trata-se da análise de um banco de dados provenientes de diversos estudos clínicos controlados randomizados realizados no Centro de Estudos Clínicos da Pós-graduação em Odontologia da Universidade Guarulhos. Todos os estudos foram submetidos ao Comitê de Ética da UNG e iniciados apenas após as devidas aprovações. Os participantes sempre foram informados dos objetivos dos estudos, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas, coletas e terapias utilizadas, quando pertinente. A participação na pesquisa foi voluntária e os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo com a Resolução nº 466/2012 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde.

Para a realização do estudo em pauta *“Redefinição do diagnóstico periodontal (clínico e microbiológico) de acordo com a nova classificação das doenças periodontais em indivíduos sistemicamente saudáveis”* não houve a manipulação de prontuários dos pacientes, apenas informações que já estão em uma base de dados numéricos sem a identificação do indivíduo.

### 3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram selecionados os dados provenientes de indivíduos sistemicamente saudáveis, com faixa etária acima de 18 anos, com diagnóstico clínico anterior compatível com periodontite crônica ou periodontite agressiva, e que possuíssem também os dados microbiológicos. Foram excluídas as informações incompletas de indivíduos fumantes e/ou diabéticos e/ou com menos de 10 dentes presentes na cavidade bucal.

Os critérios de inclusão e exclusão comumente considerados na seleção de indivíduos para os estudos clínicos anteriores cujos dados foram utilizados neste estudo estão apresentados a seguir:

*Critérios de inclusão:* voluntários portadores de periodontite crônica localizada, periodontite crônica generalizada, idade igual ou superior a 30 anos, possuir um mínimo de 15 dentes (excluindo-se os terceiros molares), mínimo de seis dentes com pelo menos um sítio interproximal não contíguo com profundidade de sondagem e nível clínico de inserção  $\geq 5$ mm, distribuídos preferencialmente nos sextantes posteriores.

*Critérios de exclusão:* diabéticos, fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos, gestantes ou lactantes, histórico de tratamento periodontal prévio nos últimos seis meses, histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses, doença sistêmica que comprometa a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento e reabilitações protéticas extensas.

### **3.3 Avaliação clínica anteriormente realizada**

O exame clínico periodontal que forneceu os dados para o periograma completo sempre foi realizado por meio de sondas periodontais manuais (Carolina do Norte, Hu-friedy, Co Inc. Chigago IL) por examinadores cegos e calibrados conforme descrito por ARAUJO et al. (2003). As mensurações clínicas foram realizadas em 6 sítios por dente (mesio-vestibular, médio-vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual/palatina, médio-lingual/palatina, disto-lingual/palatina), em todos os dentes (exceto terceiros molares, devido à grande variação na anatomia e posição na cavidade oral). Essas medidas foram feitas com a ponta da sonda paralela ao eixo do dente, no meio vestibular e palatino/lingual e o mais próximo possível das áreas interproximais. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

\* *Índice de Placa Visível* (AINAMO & BAY, 1975): Presença ou ausência de placa supragengival visível, após secagem dos dentes.

\* *Índice de Sangramento Gengival:* (AINAMO & BAY, 1975): Presença ou ausência de sangramento da gengiva marginal após percorrer levemente a margem gengival com a sonda periodontal.

\* *Profundidade de Sondagem:* Distância, em milímetros, entre a margem gengival e a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal.

\* *Nível Clínico de Inserção:* Distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal.

\* *SS:* Presença ou ausência de sangramento em até 20 segundos após sondagem.

\* *Supuração:* Presença ou ausência de supuração espontânea ou em até 20 segundos após sondagem.

### 3.4 Avaliação microbiológica anteriormente realizada

Foram selecionados seis sítios em cada indivíduo, distribuídos uniformemente de acordo com a profundidade de sondagem inicial nas seguintes categorias: dois sítios rasos (PS  $\leq$  3mm), dois intermediários (PS 4-6mm) e dois sítios profundos (PS  $\geq$  7mm). Amostras de biofilme subgengival foram retiradas com curetas Gracey do tipo minifive 11-12 estéreis, posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único golpe de raspagem no sentido ápico-coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150 $\mu$ L de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 mM EDTA (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil), pH 7,6, e a estas foram acrescentados 100 $\mu$ L de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Os tubos plásticos foram identificados com o código do indivíduo, data e sítio, e armazenados sob refrigeração a -20°C até as amostras serem processadas por meio da técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* (SOCRANSKY et al., 1994). O Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da UNG possui disponibilidade para avaliar 78 espécies bacterianas, porém, para este estudo em pauta foram considerados os resultados prévios para 40 espécies bacterianas (SOCRANSKY et al., 1998).

#### 3.4.1 Seleção das espécies bacterianas avaliadas e condições de crescimento

As sondas genômicas foram preparadas para as 40 espécies bacterianas (Tabela 1) associadas com saúde e doença periodontal por SOCRANSKY et al. (1998), SOCRANSKY E HAFFAJEE (2002). Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de Mycoplasma (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>). 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 desfibrinado de ovelha e 10  $\mu$ g/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha, 0,3  $\mu$ g/mL de menadiona (Sigma) e 5  $\mu$ g/mL de hemina (Sigma). A espécie *T. denticola* foi cultivada em caldo para crescimento de Mycoplasma suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400  $\mu$ g/mL de niacinamida (Sigma), 150



µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

**Tabela 1.** Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002).

Espécies	Cepas	Espécies	Cepas
<b>Complexo Azul</b>		<b>Complexo Laranja (cont.)</b>	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 <sup>a</sup>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>nucleatum</i>	25586 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 <sup>a</sup>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>polymorphum</i>	10953 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	12104 <sup>a</sup>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>vincentii</i>	49256 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces oris</i>	43146 <sup>a</sup>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 <sup>a</sup>
<b>Complexo Roxo</b>		<i>Parvimonas micra</i>	33270 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 <sup>a</sup>	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 <sup>a</sup>
<i>Veillonella parvula</i>	10790 <sup>a</sup>	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 <sup>a</sup>
<b>Complexo Amarelo</b>		<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 <sup>a</sup>	<b>Complexo Vermelho</b>	
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 <sup>a</sup>	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 <sup>a</sup>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 <sup>a</sup>	<i>Treponema denticola</i>	B1 <sup>b</sup>
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 <sup>a</sup>	<b>Outras Espécies</b>	
<b>Complexo Verde</b>		<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 <sup>a</sup>
<i>Aggregatibacter</i>	43718 <sup>a</sup>	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 <sup>a</sup>
<i>actinomycetemcomitans a + b</i>	29523 <sup>a</sup>	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 <sup>a</sup>	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 <sup>a</sup>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 <sup>a</sup>	<i>Propionibacterium acnes I + II</i>	11827 <sup>a</sup>
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 <sup>a</sup>		11828 <sup>a</sup>
<b>Complexo Laranja</b>		<i>Selenomonas noxia</i>	43541 <sup>a</sup>
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 <sup>a</sup>
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 <sup>a</sup>	<i>Treponema socranskii</i>	S1 <sup>b</sup>
<i>Campylobacter showae</i>	51146 <sup>a</sup>		
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection); <sup>b</sup> Forsyth Institute

### 3.4.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500xg por 10 minutos. Em seguida, as cepas gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0).

O DNA foi isolado e purificado como descrito por SMITH et al. 1989. As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do random primer digoxigenin labeling kit (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por FEINBERG & VOGELSTEIN (1983). As espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

### 3.4.3 Checkerboard DNA-DNA hybridization

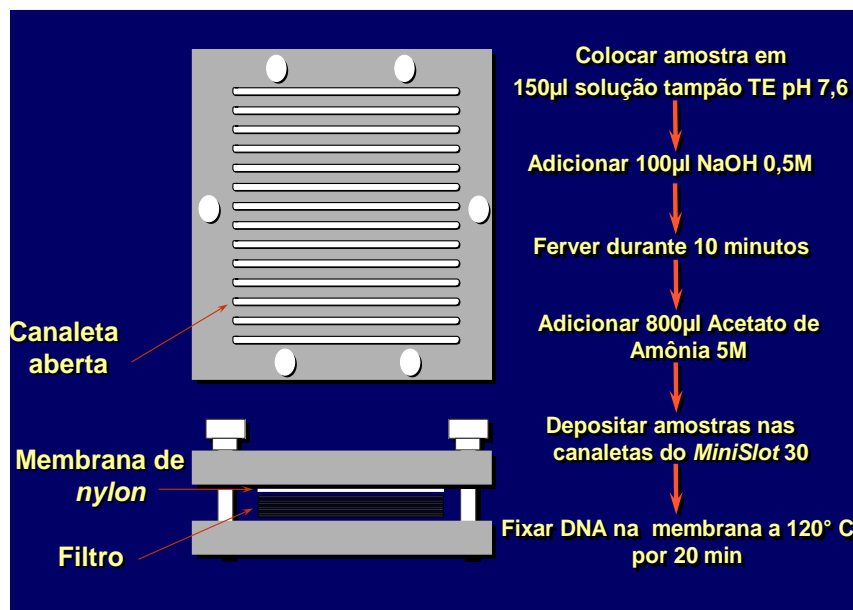
As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5M. Cada suspensão foi depositada em uma das canaletas do Minislot 30 (Immuntics, Cambridge, MA, EUA) e transferida para a membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra).

As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* (Figura 1) foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente. A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min.

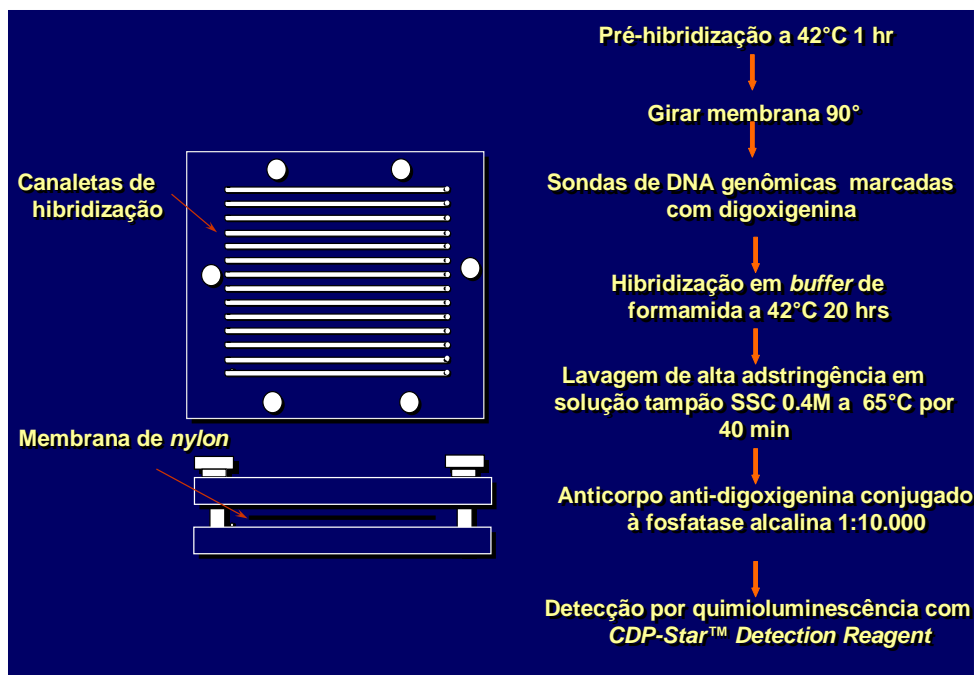
A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) (1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0, 25mM de fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Labsynth)

pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no Miniblotter 45 (Immuntics, Cambridge, MA, EUA) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato.

Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 (Figura 2) foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20  $\eta$ g/mL, em 130  $\mu$ L de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C. Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immuntics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , a fim de remover sondas que não hibridizarão completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ , Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.



**Figura 1.** Representação gráfica do Minislot 30 (Immuntics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras na membrana de nylon (técnica Checkerboard DNA-DNA hybridization).



**Figura 2.** Representação gráfica do Miniblottter 45 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras (técnica checkerboard DNA-DNA hybridization).

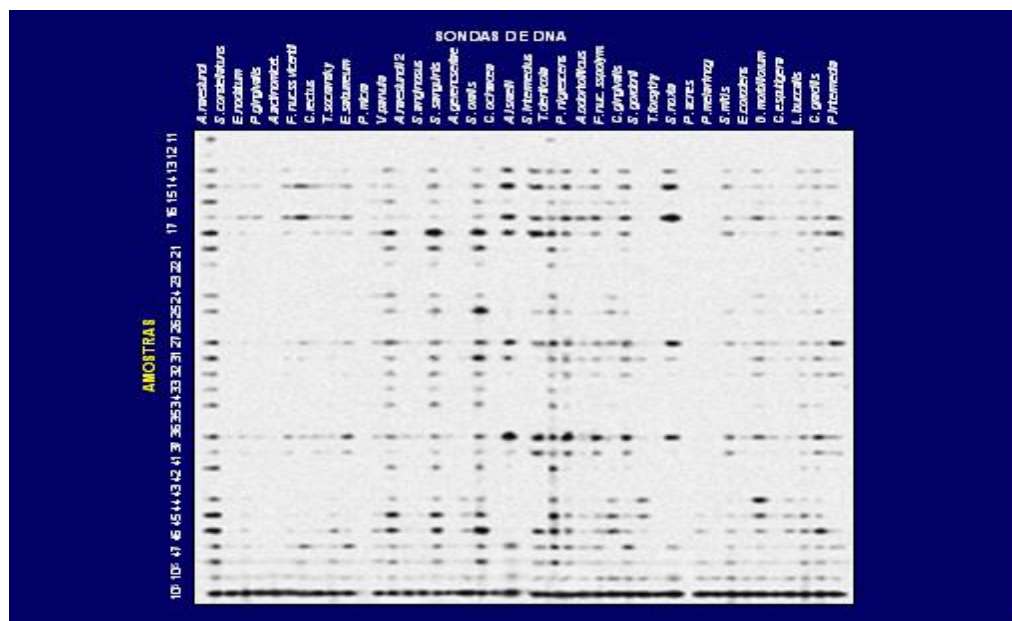
### 3.4.4 Deteccão das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do Miniblottter 45 (Immunitics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

Para a detecção dos sinais, a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, CDP-Star™ Detection Reagent (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos. O filme foi posteriormente

revelado manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções que foram utilizadas foram da marca Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas a temperatura de 20°C.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para processamento das amostras selecionadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido (Figura 3) por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo  $10^5$  e  $10^6$  bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaliu a um sinal menos intenso que o controle de  $10^5$  células; 2 equivaliu a  $10^5$  células; 3 entre  $10^5$  e  $10^6$  células; 4 a aproximadamente  $10^6$  células e 5 mais de  $10^6$  células (Tabela 2). Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras a serem avaliadas.



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

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

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

### 3.5 Classificação atual das doenças periodontais

Os dados clínicos foram avaliados quanto aos novos critérios para a classificação da periodontite em **Estágios** e **Grau** (PAPAPANOU et al., 2018) e seguidos para a redefinição do diagnóstico clínico periodontal dos dados provenientes de indivíduos sistemicamente saudáveis participantes de estudos anteriores. De acordo com os *Estágios*, a doença foi caracterizada quanto sua severidade, complexidade, extensão e distribuição e, o *Grau* evidenciou o risco para futura progressão da doença.

#### 3.5.1 Descrição do algoritmo da nova classificação para os Estágios III e IV

Considerando a quantidade de sítios para cada indivíduo, estimou-se a quantidade de dentes com base na seguinte razão:

$$\text{Quantidade de Dentes} = \frac{\text{Número de Sítios}}{6}$$

Com base nos critérios:

- a) Quando a quantidade de dentes foi maior que 24, classificou-se como Estágio III
- b) Quando a quantidade de dentes foi menor ou igual a 24, classificou-se como Estágio IV

#### 3.5.2 Descrição do algoritmo da nova classificação para os Graus A, B ou C

Considerando apenas os sítios interproximais, verificou-se para cada indivíduo o maior valor de NCI em milímetros. Alguns indivíduos possuíam o mesmo valor máximo distribuído em mais de um sítio, neste caso, escolheu-se um sítio de modo aleatório para assim associá-lo ao dente com o maior valor de NCI, levando-se em conta o respectivo comprimento da raiz do dente também selecionado de modo aleatório). Após a identificação do dente com o

maior NCI (NCI-Max), considerou-se o comprimento da raiz para assim gerar o percentual de perda óssea, de acordo com a razão:

$$\text{Perda óssea(\%)} = \frac{\text{NCI-Max}}{\text{Raiz-2mm}} \times 100$$

À partir da equação anterior, calculou-se a ponderação desse percentual em relação a idade do indivíduo:

$$\text{Perda óssea (PO)} = \frac{\text{Perda óssea (\%)}}{\text{Idade}}$$

Finalmente, três categorias foram geradas com base nessa relação:

- 1) PO < 0,25mm – GRAU A
- 2) PO entre 0,25mm e 1,00mm – GRAU B
- 3) PO > 1,00 mm – GRAU C

### 3.6 Análise estatística

#### *Avaliação clínico-periodontal*

A média de boca toda dos parâmetros clínicos avaliados foi computada para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. De maneira semelhante, os parâmetros clínicos foram categorizadas em sítios rasos (PS ≤ 3mm), intermediários (PS 4-6 mm), e profundos (PS ≥ 7mm). Foram utilizados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA post hoc), com testes de Dunn para as posteriores comparações múltiplas de 2 a 2. Para a variável idade que apresentou distribuição normal em cada grupo, utilizou-se o teste paramétrico ANOVA de 1 fator, com o teste de Tukey HSD para as posteriores comparações múltiplas de 2 a 2. A significância estatística foi estabelecida em 5% (p<0,05).

#### *Avaliação microbiológica*

Os dados microbiológicos resultaram da análise das 40 espécies bacterianas nas amostras de biofilme subgingival por indivíduo. Foram expressos de duas maneiras: contagens (níveis) e percentual de contagem das sondas de DNA (proporção). Os níveis médios (x 10<sup>5</sup>) e a proporção de cada espécie foram computadas para cada sítio, depois em cada indivíduo e, em seguida, em um mesmo grupo terapêutico em cada tempo experimental. Os dados iniciais (níveis e proporções) foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (ANOVA post hoc), com testes de Dunn para as posteriores comparações múltiplas de 2 a 2, com o objetivo de detectar possíveis diferenças microbiológicas significantes entre os grupos

encontrados em relação à análise clínica primária em Estágio e Grau. A significância estatística foi estabelecida em 5%.



## 4 RESULTADOS

As informações obtidas à partir da análise do banco de dados clínicos e microbiológicos de indivíduos anteriormente diagnosticados com periodontite crônica estão apresentados na Tabela 3 e Figura 4. Os dados de 354 indivíduos, com idade variando entre 40 e 53 anos, foram incluídos nas análises estatísticas, sendo que 126 indivíduos foram categorizados no Estágio III (35 no Grau B e 91 no Grau C) e 228 indivíduos foram categorizados no Estágio IV (54 no Grau B e 174 no Grau C). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em todos os parâmetros, exceto no percentual de sítios com biofilme visível e percentual de sítios com sangramento gengival (Tabela 3). Como esperado, os indivíduos categorizados em Estágio IV Grau C apresentaram o maior comprometimento periodontal.

Em relação aos dados microbiológicos, a Figura 4 apresenta a média das proporções dos complexos microbianos (SOCRANSKY et al. 1998). As proporções dos complexos associados às bactérias benéficas compatíveis com saúde periodontal (complexos verde, amarelo, roxo e grupo de *Actinomices* sp) mostraram similaridades entre os quatro grupos ( $p>0,05$ ). Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os complexos laranja e vermelho formados por microrganismos periodontopatogênicos. Os maiores percentuais de complexos laranja e vermelho foram encontrados no grupo Estágio IV grau C. Em relação ao complexo vermelho, o grupo Estágio III grau B apresentou proporções similares ao grau C, mas a menor proporção de complexo vermelho comparada ao grupo Estágio IV graus B e C.

A análise dos níveis individuais (média de contagem x  $10^5$ ) das 40 espécies bacterianas demonstrou diferenças estatisticamente significantes em apenas quatro espécies. Quando analisadas separadamente, os níveis das três espécies do complexo vermelho e uma espécie do complexo laranja (*Fusobacterium nucleatum ssp. polymorphum*) apresentaram diferenças significativas entre os grupos. O Estágio IV grau C apresentou maiores níveis de *Porphyromas gingivalis* ( $p=0,007$ ), *Treponema denticola* ( $p=0,000$ ) e *F. nucleatum.ssp.polymorphum* ( $p=0,009$ ) quando comparado ao Estágio III grau B, maiores níveis de *Tanerella forsythia* ( $p=0,000$ ) quando comparado ao Estágio II graus B e C e maiores níveis de *T. denticola* quando comparado ao Estágio IV grau B ( $p=0,000$ ). Além disso, maiores níveis de *T. forsythia* foram observados no Estágio IV grau B quando comparado ao Estágio III

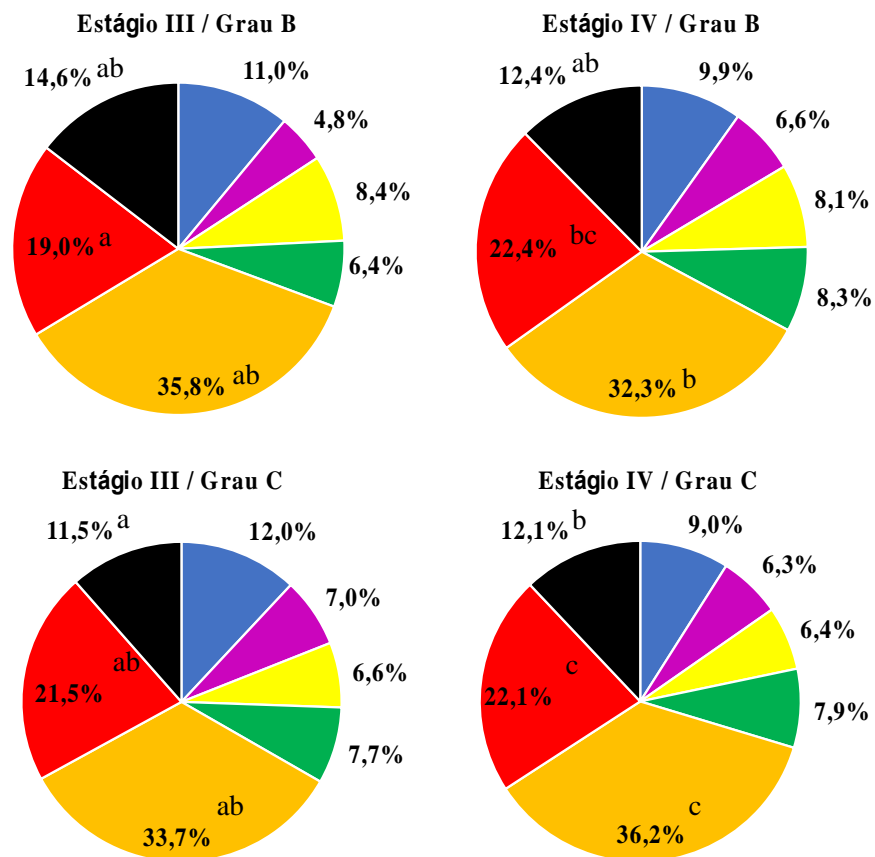
grau B ( $p=0,000$ ). No grupo com indivíduos categorizados em Estágio III, foi observado maiores níveis de *T. denticola* no grau C quando comparado ao grau B ( $p=0,000$ ).

**Tabela 3.** Características epidemiológicas e médias dos parâmetros clínicos periodontais ( $\pm$  desvio padrão) da população do estudo, no exame inicial.

Variáveis	GRUPOS				p-value
	ESTÁGIO III		ESTÁGIO IV		
	Grau B (N=35)	Grau C (N=91)	Grau B (N=54)	Grau C (N=174)	
Idade (anos)	53 $\pm$ 10 a	40 $\pm$ 10 c	54 $\pm$ 9 a	44 $\pm$ 9 b	0,000
Número de dentes	27 $\pm$ 1 b	26 $\pm$ 1 b	20 $\pm$ 3 a	21 $\pm$ 3 a	0,000
Número de sítios	160 $\pm$ 8 b	157 $\pm$ 6 b	122 $\pm$ 15 a	125 $\pm$ 15 a	0,000
<b>% sítios com</b>					
PS < 4mm	57,1 $\pm$ 14,8 b	54 $\pm$ 16,1 b	56,8 $\pm$ 15,1 b	50,6 $\pm$ 17,4 a	0,000
PS 4-6mm	60,2 $\pm$ 19,6 b	55,8 $\pm$ 17,5 b	45,9 $\pm$ 16,2 a	46,2 $\pm$ 16,7 a	0,000
PS $\geq$ 5mm	24,2 $\pm$ 11,8 ab	30,7 $\pm$ 15,8 b	25,9 $\pm$ 14,6 a	35 $\pm$ 16,9 b	0,000
PS $\geq$ 6mm	11,3 $\pm$ 8,6 a	18,7 $\pm$ 13,7 b	13,3 $\pm$ 11,6 a	22,1 $\pm$ 14,2 b	0,000
PS $\geq$ 7mm	5,1 $\pm$ 6,7 a	10,4 $\pm$ 9,6 b	5,8 $\pm$ 7,9 a	12,5 $\pm$ 10,8 b	0,000
PS (mm)	3,6 $\pm$ 0,6 a	3,9 $\pm$ 0,7 ab	3,6 $\pm$ 0,6 a	4,1 $\pm$ 0,8 b	0,000
NCI (mm)	3,7 $\pm$ 0,6 a	4,2 $\pm$ 0,8 b	4,1 $\pm$ 0,7 ab	4,8 $\pm$ 1 c	0,000
<b>% sítios com</b>					
Biofilme visível	65,9 $\pm$ 18,1	67,6 $\pm$ 20,1	72,6 $\pm$ 17,8	71,5 $\pm$ 19,3	0,168
Sangramento gengival	24 $\pm$ 23,7	31,1 $\pm$ 24,7	31,6 $\pm$ 22,6	33,7 $\pm$ 25,1	0,208
Sangramento à sondagem	58,7 $\pm$ 22,2 a	64,4 $\pm$ 21,9 ab	63,4 $\pm$ 18,7 ab	69,5 $\pm$ 19,5 b	0,012
Supuração	1,4 $\pm$ 3,5 a	5,7 $\pm$ 9,2 bc	3,5 $\pm$ 6,3 ac	9,1 $\pm$ 12,7 b	0,000

PS: Profundidade de Sondagem; NCI: Nível Clínico de Inserção.

Teste Kruskal-Wallis (ANOVA post hoc) e teste de Dunn ANOVA: letras minúsculas distintas indicam as diferenças existentes entre os grupos.



**Figura 4.** Média das proporções dos complexos microbianos (Socransky et al., 1998; Socransky; Haffajee et al., 2002) nos grupos de indivíduos categorizados em Estágio III (Graus B e C) e Estágio IV (Graus B e C).

Teste Kruskal-Wallis (ANOVA post hoc) e teste de Dunn ANOVA: letras minúsculas distintas indicam as diferenças existentes entre os grupos.

## 5 DISCUSSÃO

O Proceedings do Workshop Mundial para a Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares foi lançado em junho de 2018 (PAPAPANOU et al., 2018; TONETTI et al., 2018). Essa publicação representou um esforço conjunto da Academia Americana de Periodontia (AAP) e da Federação Europeia de Periodontia e levou à substituição da classificação vigente até aquele momento. Para as condições periodontais, são três grandes grupos:

1 Saúde Periodontal, Condições e Doenças Gengivais, subdividido em:

1.1 Saúde Periodontal e Saúde Gengival

1.2 Gengivite Induzida pelo Biofilme

1.3 Doenças Gengivais Não Induzidas pelo Biofilme

2 Periodontite, subdividido em:

2.1 Doenças Periodontais Necrosantes

2.2 Periodontite

2.3 Periodontite como Manifestação de Doenças Sistêmicas

3 Outras Condições que afetam o Periodonto, subdividido em:

3.1 Manifestações Periodontais de Doenças ou Condições Sistêmicas (Doenças ou Condições Sistêmicas que afetam os Tecidos Periodontais de Suporte)

3.2 Abscessos Periodontais e Lesões Endoperiodontais

3.3 Condições e Deformidades Mucogengivais

3.4 Forças Oclusais Traumáticas

3.5 Fatores Relacionados ao Dente

Esta nova classificação, fruto de um grande estudo e entendimento do estado da arte, apresenta-se com um carácter dinâmico, com grande adaptabilidade. Assim, com os avanços científicos futuros no âmbito da Periodontia, será possível acrescentar novos critérios à classificação atual, evitando assim a necessidade de uma remodelação radical de toda a classificação. Em adição, esta classificação foi concebida de maneira a que pudesse ser implementada no ambiente clínico, mas também no âmbito da investigação e de estudos epidemiológicos (TONETTI et al., 2018). Entre todas as alterações feitas, salienta-se o facto de, pela primeira vez, se introduzir o conceito de saúde periodontal e de condições/doenças peri-implantares na classificação. Destaca-se ainda a substituição dos termos “crónica” e

“agressiva” para caracterizar a doença periodontal, passando-se então a definir a doença segundo diferentes estágios e graus.

Pensando em um pouco de história, em 1999, a AAP classificou as periodontites em dois principais tipos: crônica e agressiva. A periodontite crônica (PCr) foi classificada como de progressão lenta, mais comumente encontrada em adultos e associada a acúmulo de grande quantidade de biofilme e/ou cálculo. O termo periodontite agressiva (PAg) foi introduzido para definir um grupo de doenças periodontais destrutivas com progressão rápida e normalmente associada a pouco acúmulo de biofilme e/ou cálculo (LANG et al., 1999). A PAg foi ainda dividida em (i) localizada (PAgL), que estava associada a perda de inserção em primeiros molares e incisivos, e (ii) generalizada (PAgG), não necessariamente derivada da forma localizada, mas sim uma expressão de um processo patogênico diferenciado e mais intenso que acometesse pelo menos 3 outros dentes que não os molares e incisivos (TONETTI; MOMBELLI, 1999). O termo PAg abrangeu classificações prévias de periodontite, como: a de início precoce, a juvenil e a de progressão rápida (AAP, 1989). A principal diferença entre a classificação de 1999 e a anterior foi que o termo PAg passou a se basear principalmente na rapidez da progressão da doença e não na idade de início. Além da rápida progressão, a agregação familiar e saúde sistêmica também foram consideradas características importantes da PAg, seguindo conceitos já descritos três décadas antes (BAER, 1971). Ao destruir progressivamente o periodonto, a PCr e a PAg, se não tratadas, podem promover a perda dos dentes acometidos. Os principais eventos histopatológicos em ambas as doenças são: (i) alterações inflamatórias agudas em resposta à colonização microbiana, (ii) influxo de neutrófilos em relação aos componentes microbianos do biofilme subgingival, (iii) desprendimento do epitélio juncional e a sua conversão para o epitélio da bolsa, (iv) destruição inflamatória do tecido conjuntivo adjacente ao epitélio da bolsa, (v) acúmulo de células inflamatórias crônicas, (vi) migração apical do epitélio para a raiz do dente e, (vii) reabsorção do osso alveolar.

Desde a publicação da Classificação de 1999 (ARMITAGE, 1999), pesquisadores e clínicos se dedicaram a identificar reais diferenças entre PCr e PAg (DOGAN et al., 1999; DARBY et al., 2000; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000; FAVERI et al., 2009; ARMITAGE, 2010; ARMITAGE & CULLINAN, 2010; SMITH et al., 2010; STABHOLZ et al., 2010; DUARTE et al., 2015; MONTENEGRO et al., 2020). Alguns estudos propuseram que o tipo da resposta do hospedeiro ao desafio bacteriano ou certas alterações genéticas (SHAPIRA et al., 1994) poderiam contribuir para as diferentes características clínicas ou na velocidade de progressão entre a PAgG, PAgL ou PCr (GARLET et al., 2003; MENG et al., 2007; HWANG et al., 2014;

DUARTE et al., 2015). SMITH et al. (2010), compararam a natureza do infiltrado inflamatório encontrados nos casos de PCr e PAg e não encontraram diferenças que pudessem explicar distintas velocidades de progressão entre as duas condições clínicas. BARTOLD et al. (2010) constataram que as lesões periodontais de pacientes com PCr e PAg são bioquimicamente semelhantes em relação aos mediadores moleculares e processos patológicos que levam à perda óssea alveolar. Similarmente, uma revisão sistemática recente sugeriu que o peso atual da evidência não é suficiente para sustentara existência de perfis distintos de citocinas/quimiocinas em pacientes com PCr e PAg (DUARTE et al., 2015).

Muito também tem sido discutido ao longo dos anos sobre a composição da microbiota subgengival e as possíveis diferenças entre os perfis microbianos da PCr e PAg. Porém, as pesquisas mais precisas nessa área passaram por dificuldades técnicas por muito tempo relacionadas a identificação de uma microbiota mista, na sua maioria anaeróbia estrita, com alta exigência nutricional e vivendo numa estrutura organizada do biofilme (SOCRANSKY et al., 1998; KAPLAN et al., 2009; ARMITAGE, 2010; FILOCHE et al., 2010). Vale também destacar que apenas 50-60% da microbiota subgengival da PCr e PAg podem ser cultivadas em laboratório usando técnicas de cultura de ponta. O restante da microbiota é classificada como não cultivável (WILSON et al., 1997; FAVERI et al., 2008; PASTER & DEWHIRST et al., 2009), o que dificulta ainda mais o estudo dessas espécies. Apesar de todas dificuldades acima relacionadas, a microbiota periodontal tem sido estudada desde a década de 1970. Ao longo dos anos, vários estudos sugeriram que patógenos e/ou complexos microbianos específicos poderiam estar associados ao início e a progressão de cada condição clínica (BOTERO et al., 2007; SCHACHER et al., 2007; ARMITAGE et al., 2010; HELLER et al., 2012). Proporções elevadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e de *Porphyromonas gingivalis* foram associadas à PAg (LANG et al., 1999) e por muito tempo o *A. actinomycetemcomitans* foi considerado o único patógeno realmente relacionado com a etiologia da PAgL (HAUBEK et al., 2002; 2008; YANG et al., 2004; FINE et al., 2007). Em 2002, uma revisão sistemática (MOMBELLI et al., 2002), questionou se a presença ou ausência de cinco patógenos periodontais, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *T. forsythia* e *C. rectus*. Os autores concluíram que não existia evidência na literatura para afirmar a existência de diferenças específicas entre a microbiota dessas duas condições clínicas. Posteriormente, Favari et al. (2009) e Feres et al. (2015) avaliaram pela primeira vez as proporções dos complexos bacterianos (SOCRANSKY et al., 1998) no biofilme subgengival de indivíduos com saúde periodontal, PAgL, PAgG e PCr e observaram uma grande semelhança entre os perfis microbianos dessas três condições clínicas. Considerando-se

que a literatura referente a possíveis diferenças microbiológicas entre PAg e PCr ainda é controversa, e que nenhum estudo havia compilado toda informação científica disponível sobre esse assunto, Montenegro et al. (2020) propôs a realização de uma revisão sistemática nesse tema relevante, pois o conhecimento aprofundado sobre a microbiologia das doenças periodontais contribui para um melhor direcionamento das terapias para essas infecções. Montenegro et al. (2020) observou um total de 488 artigos sendo que 56 foram incluídos na revisão sistemática. Treze estudos encontraram *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em níveis elevados na PAg em comparação com a PCr, enquanto *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, e *Campylobacter rectus* estavam elevados em PAg em alguns estudos. Nenhuma dessas espécies estavam elevadas em PCr. Entretanto, o número de estudos que não evidenciaram alguma diferença estatística entre PCr e PAg sempre foi maior do que os estudos que mostraram diferenças. Os autores concluíram que existe a associação de *A. actinomycetemcomitans* com a PAg, mas nenhuma espécie foi a única em determinada doença, ou pode ser capaz de diferenciar a PCr da PAg.

O conhecimento sobre essa semelhança entre a PCr e as PAg foi um dos fatores que embasou os novos pilares da classificação atual das doenças periodontais. Neste contexto, este estudo em pauta foi o primeiro a redefinir um banco de dados e relacionar essas informações com o perfil microbiológico dos mesmos pacientes. Os resultados demonstraram que o perfil microbiológico dos indivíduos categorizados em Estágio III ou Estágio IV da nova classificação das doenças periodontais representa suas características clínicas em relação à severidade da doença.

## **6 CONCLUSÃO**

A partir da análise dos resultados, concluiu-se que as diferenças clínicas categorizados em Estágios III ou IV (graus B ou C) são suportadas por diferenças microbiológicas especialmente relacionadas aos níveis e proporções das espécies bacterianas do complexo vermelho.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25: 229-35.
2. American Academy of Periodontology. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago: The American Academy of Periodontology; 1989: I/23-I/24.
3. Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol*. 2003; 74: 1736-40.
4. Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; 53: 70–88.
5. Armitage GC, Cullinan MP. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; 53: 12–27.
6. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999; 4:1-6.
7. Baer PN. The case for periodontosis as a clinical entity. *J Periodontol*. 1971; 42 (8): 516-20.
8. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathological bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; 53: 55–69.
9. Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J Periodontol*. 2007; 78: 696–704.
10. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*. 2018; 89; (1): S1-S8.

11. Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol.* 2000; 27 (6): 417-24.
12. Dogan B, Saarela MH, Jousimies-Somer H, Alaluusua S, Asikainen S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype e –biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status. *Oral Microbiol Immunol.* 1999; 14: 98–103.
13. Duarte PM, Bastos MF, Fermiano D, Rabelo CC, Perez-Chaparro JP, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review. *J Periodont Res.* 2015; 50: 18–27.
14. Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009;36(9): 739-749.
15. Faveri M, Mayer MPA, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23: 112–118.
16. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 1983;301 (5895): 89-92.
17. Feres M, Cortelli SC, Figueiredo LC, Haffajee AD, Socransky, SS. Microbiological basis for periodontal therapy. *Journal of Applied Oral Science.* 2004; 12 (4), 256-266.
18. Feres M, Figueiredo LC, Soares GM, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol 2000.* 2015 67:131-86.
19. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010: 89: 8–18.
20. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation

- of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 3859–3869.
21. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003; 38:210–217.
  22. Gasner NS, Schure RS. Periodontal Disease. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; May 18, 2020.
  23. 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.
  24. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet.* 2008; 371: 237–242.
  25. Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 196-209.
  26. Heller D, Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Colombo AP. Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 2012; 57:973–980.
  27. Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J* 2009; 54 Suppl. 1: S11-26.
  28. Hwang AM, Stoupel J, Celenti R, Demmer RT, Papapanou PN. Serum antibody responses to periodontal microbiota in chronic and aggressive periodontitis: a postulate revisited. *J Periodontol.* 2014; 85(4): 592-600.
  29. Kaplan CW, Lux R, Haake SK, Shi W. The *Fusobacterium nucleatum* outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm. *Mol Microbiol.* 2009; 71: 35–47.

30. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol.* 2009; 36 (9): 765-74.
31. Kazor C. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 558-563.
32. Lang N, Bartold PM, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, Page R, Papapanou P, Tonetti M, Van Dyke T. Consensus report: aggressive periodontitis. *Annals Periodontol.* 1999; 4:53.
33. Linden GJ, Mullally BH. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J Periodontol.* 1994; 65: 718-23.
34. Loe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993; 16: 329-34.
35. Mann J, Bernstein Y, Findler M. Periodontal disease and its prevention, by traditional and new avenues. *Exp Ther Med.* 2020;19 (2): 1504-1506.
36. Meng H, Xu L, Li Q, Han J, Zhao Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2007; 43: 133–159.
37. Mishra R, Chandrashekar KT, Tripathi VD, Trivedi A, Daryani H, Hazari A. Analysis of curtailing prevalence estimates of periodontitis post the new classification scheme: A cross-sectional study. *J Indian Soc Periodontol.* 2019; 23 (6): 569-573.
38. 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; 3: 10–21.
39. Montenegro SCL, Retamal-Valdes B, Bueno-Silva B, Duarte PM, Faveri M, Figueiredo LC, Feres M. Do patients with aggressive and chronic periodontitis exhibit specific differences in the subgingival microbial composition? A systematic review. *J Periodontol.* 2020 Mar 31.

40. Novak MJ, Potter RM, Blodgett J, Ebersole JL. Periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2008; 79: 629-36.
41. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH. et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(20): S162-S170.
42. Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol 2000.* 2009; 51: 38-44.
43. Preshaw PM, de Silva N, McCracken GI, Fernando DJ, Dalton CF, Steen ND, et al. Compromised periodontal status in an urban Sri Lankan population with type 2 diabetes. *J Clin Periodontol.* 2010; 37(2): 165-71.
44. Schacher B, Baron F, Rossberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 566–573.
45. Shapira L, Eizenberg S, Sela MN, Soskolne A, Brautbar H. HLA A9 and B15 are associated with the generalized form but not the localized form, of early-onset periodontal diseases. *J Periodontol.* 1994; 65: 219–223.
46. Slots J, Nowzari H. Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1994; 21:203-10.
47. Smith M, Seymour GJ, Cullinan MP. Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010; 53: 45–54.
48. Smith G. L. F., Socransky S. S. and Sansone C. (1989) “Reverse” DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiol. Immun.* 4, 141-145.
49. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques.* 1994; 17:788-792.

50. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000. 2002; 28: 12-55.
51. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent JRL. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998; 25: 134-144.
52. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 135–187.
53. Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010; 53:138-53.
54. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol*. 1998; 69: 76-83.
55. Teles RP, Patel M, Socransky SS, Haffajee AD. Disease progression in periodontally healthy and maintenance subjects. *Journal of Periodontology*. 2008; 79: 784-794.
56. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018; 45(20): S149-S161.
57. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):39-53.
58. Vouros ID, Kalpidis CD, Chadjipantelis T, Konstantinidis AB. Cigarette smoking associated with advanced periodontal destruction in a Greek sample population of patients with periodontal disease. *J Int Acad Periodontol*. 2009; 11: 250-57.
59. Wilson MJ, Weightman AJ, Wade WG. Applications of molecular biology in the characterisation of uncultured microorganisms associated with human disease. *Rev Med Microbiol*. 1997; 8: 91–101.
60. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra-and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000; 27: 648–657.

61. Yang HW, Asikainen S, Dogan B, Suda R, Lai CH. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol.* 2004; 75: 592–599.