VIVIANE APARECIDA ARENAS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO QUALITATIVA, QUANTITATIVA E GENOTÍPICA
DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium
nucleatum* ISOLADOS DE PACIENTES COM DIFERENTES
CONDIÇÕES CLÍNICAS BUCAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

VIVIANE APARECIDA ARENAS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO QUALITATIVA, QUANTITATIVA E GENOTÍPICA
DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium
nucleatum* ISOLADOS DE PACIENTES COM DIFERENTES
CONDIÇÕES CLÍNICAS BUCAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rodrigues, Viviane Aparecida Arenas.

Avaliação qualitativa, quantitativa e genotípica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* isolados de pacientes com diferentes condições clínicas bucais / Viviane Aparecida Arenas Rodrigues. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bactérias anaeróbias de interesse médico-odontológico e veterinário.

Versão do título para o inglês: Qualitative, quantitative and genotypic evaluation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* isolated from patients with different oral clinical conditions.

1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 2. *Fusobacterium nucleatum* 3. Microbiologia oral 4. Doença periodontal 5. Patógenos periodontais 6. Tipagem bacteriana I. Avila-Campos, Prof. Dr. Mario Julio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB029/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Viviane Aparecida Arenas Rodrigues.

Título da Tese: Avaliação qualitativa, quantitativa e genotípica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* isolados de pacientes com diferentes condições clínicas bucais.

Orientador(a): Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 19 de agosto de 2009.

PARECER 910/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 97ª reunião realizada em 18.08.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Avaliação qualitativa e quantitativa de Aggregatibacter actinomycetemcomitans e Fusobacterium nucleatum isolados de pacientes em diferentes condições clínicas bucais e determinação genotípica bacteriana"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **18 de agosto de 2010.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma Sra.
VIVIANE APARECIDA ARENAS RODRIGUES
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Ao meu esposo Everton pelo apoio incansável e pelo incentivo diário para concretizar esta etapa profissional.

A minha filha Mariana, por seu amor, carinho e luz, e por compartilharmos nossos sentimentos e alegrias a cada conquista.

Dedico a vocês este trabalho com amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus pela vida de alegria e saúde, pela família abençoada que recebi, e por toda sua luz, cuidado, orientação e proteção.

Ao meu amado pai Donizete (in memoriam) que me ensinou o significado do amor e da gratidão.

A minha mãe Célia, exemplo de mulher, meu porto seguro, que me incentivou com a sua doçura e sabedoria a insistir nos meus sonhos, orientou a minha caminhada com o seu carinho, equilíbrio e paciência. Minha eterna gratidão.

As minhas irmãs Cristiane e Anna Célia, por todo carinho, incentivo e apoio. Muito obrigada.

A querida avó Ana (in memoriam) e avô Antônio (in memoriam) sempre presente em meus pensamentos e orações.

A minha querida avó Nena (in memoriam) e meu avô Antônio, que estiveram sempre adoçando a minha vida com carinho, dedicação e amor incondicional.

As minhas tias Maria Helena e Maria Cristina, que sempre estiveram ao meu lado desde a graduação acompanhando, apoiando, acreditando e me incentivando sempre.

Ao Professor Dr. Mario Julio Avila-Campos pela determinação, paciência e conhecimento científico. Obrigada pela oportunidade e por contribuir com sua experiência profissional em minha formação.

Eu gostaria muito que o sentimento de gratidão tivesse palavras próprias, obrigada pelas incansáveis correções, atenção e cuidado na elaboração deste trabalho.

Muitíssimo obrigada Prof. Mario por dizer desde o primeiro dia que comecei no Laboratório de Anaeróbios "não vai ser fácil, tem que trabalhar e ter disciplina e dedicação para assim, alcançar seus objetivos".

Sou grata, e levarei comigo este aprendizado durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Viviane Nakano pela amizade e atenção, estando sempre disposta a contribuir com seus conhecimentos, muito obrigada por sua dedicação, carinho e auxílio.

Ao Prof. Dr. André Gasparetto que me ajudou a encontrar a Microbiologia durante a graduação, e me incentivou a continuar na pós-graduação.

À Sheila Nishiyama Belini, Miriam Rodriguez Fernandes e Aline Ignácio por todo carinho, atenção, companheirismo e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do Laboratório de Anaeróbios, Thais Wahasugui, Rafael Castillo, Alfredo Feitosa, Tânia Alen, Gisela Pereira, Luis Llanco, Naiane Cardoso, Claudia Freire e Gabriela Freire, obrigada por todo carinho e amizade.

Às queridas Zulmira Alves e Márcia Harumi pelo auxílio técnico, e por toda atenção e abraços durante a pós-graduação. A companhia e o apoio de vocês fizeram meus dias de experimentos e estudos muito felizes. Muito obrigada!!!

Aos professores do Departamento de Microbiologia do ICB/USP, pelos conhecimentos transmitidos que contribuíram para minha formação profissional, e levarei comigo por toda minha vida.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia Alice Shimabuko e Ana Maria Amaral que sempre estiveram presentes no início da pós-graduação. À Naide Farripas, Gisele da Graça Santana, Elizabete dos Santos e Ana Izabel Ferraz pela atenção e apoio constante.

Aos bibliotecários do ICB, em especial Renata Santos, Edilson de Oliveira Bernardino, e Tereza Cristina Soutto Mayor pelo apoio e auxílio na revisão técnica bibliográfica deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Microbiologia pelo profissionalismo e auxílio cedidos durante o desenvolvimento desta Tese.

À Rosana Prisco por toda atenção recebida, pela dedicação e disponibilidade na realização das análises estatísticas, pela sua gentileza, disposição, e profissionalismo.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida durante o curso de doutorado.

Finalmente, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

***“Os ideais que iluminaram meu caminho
e sempre me deram coragem para
enfrentar a vida com alegria foram a
Verdade, a Bondade e a Beleza”***

Albert Einstein

***“Ninguém caminha sem aprender a
caminhar, sem aprender a fazer o caminho
caminhando, refazendo e retocando o sonho
pelo qual se pôs a caminhar”***

Paulo Freire

***“Cada pessoa que passa em nossa vida
passa sozinha, e é porque cada pessoa é
única e nenhuma substitui a outra”***
***“Cada pessoa que passa em nossa vida passa
sozinha e não nos deixa só porque deixa um
pouco de si e leva um pouquinho de nós”***
***“Essa é a mais bela responsabilidade da vida
e a prova de que as pessoas não se
encontram por acaso”***

Charles Chaplin

RESUMO

RODRIGUES, V. A. A. **Avaliação qualitativa, quantitativa e genotípica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* isolados de pacientes com diferentes condições clínicas bucais.** 2015. 80 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans e *Fusobacterium nucleatum* são microrganismos gram-negativos presentes nos processos inflamatórios e nas diferentes formas da doença periodontal. Ambos formam parte da microbiota residente da cavidade bucal humana podendo levar ao desenvolvimento de infecções endógenas ou exógenas. Neste estudo, as avaliações qualitativa, quantitativa e genotípica de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* isolados de pacientes com gengivite, periodontite crônica e indivíduos saudáveis foram realizadas. Biofilmes subgengivais de 70 pacientes com gengivite, 75 com periodontite crônica e 95 indivíduos saudáveis foram avaliados. *A. actinomycetemcomitans* foi isolado em 2 (2,8%) pacientes com gengivite, 4 (5,3%) com periodontite e 5 (5,3%) saudáveis; e *F. nucleatum* em 13 (18,6%) pacientes com gengivite, 20 (26,6%) com periodontite crônica e 19 (20%) saudáveis. Ambos os microrganismos foram isolados em 5 (7,1%) pacientes com gengivite, 9 (12%) com periodontite crônica e 3 (3,15%) saudáveis. Por PCR, os DNA de *A. actinomycetemcomitans* foram detectados em 23 (32,8%) pacientes com gengivite, 20 (26,6%) com periodontite crônica e 38 (40%) indivíduos saudáveis; e de *F. nucleatum* em 17 (24,3%) pacientes com gengivite, 11 (14,6%) com periodontite e 19 (20%) saudáveis. Em associação esses microrganismos foram detectados em 23 (32,8%) pacientes com gengivite, 40 (53,3%) com periodontite crônica e 17 (17,8%) saudáveis. *A. actinomycetemcomitans* isolados de pacientes com gengivite pertenceram aos biotipos I, II, IV, V e X, e aos sorotipos a, c, e e. Em pacientes com periodontite foram encontrados os biotipos II, VI e X, e os sorotipos a, b, e c, sendo o sorotipo c o mais predominante (80%); e em indivíduos saudáveis os biotipos II e X, e os sorotipos b e c. Os valores quantitativos de *A. actinomycetemcomitans* para os três grupos analisados variaram em número de cópias de 0 a $1,14 \times 10^8$, e de *F. nucleatum* de 0 a $3,98 \times 10^6$. Os resultados obtidos por AP-PCR mostram a heterogeneidade dos isolados de *A. actinomycetemcomitans* e de *F. nucleatum* nos diferentes grupos clínicos de pacientes avaliados. Esses resultados comparativos poderão ser levados em consideração pelos clínicos para melhor direcionar o tratamento da doença periodontal, colaborando de forma efetiva para o seu monitoramento.

Palavras-chave: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Fusobacterium nucleatum*. Biofilme subgengival. Gengivite. Periodontite crônica.

ABSTRACT

RODRIGUES, V. A. A. **Qualitative, quantitative and genotypic evaluation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* isolated from patients with different oral clinical conditions.** 2015. 80 p. PH. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans and *Fusobacterium nucleatum* are gram-negative microorganisms observed in inflammatory processes and different forms of periodontal disease. Both are part of the human oral resident microbiota which may cause endogenous or exogenous infections. In this study, a qualitative, quantitative and genotypic analysis of *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* isolated from patients with gingivitis, chronic periodontitis and healthy subjects were determined. Subgingival biofilms of 70 patients with gingivitis, 75 with chronic periodontitis and 95 healthy subjects were evaluated. *A. actinomycetemcomitans* was isolated in 2 (2,8%) patients with gingivitis, 4 (5,3%) with periodontitis and 5 (5,3%) healthy individuals; and *F. nucleatum* in 13 (18,6%) patients with gingivitis, 20 (26,6%) with chronic periodontitis and 19 (20%) healthy. Both microorganisms were identified in 5 (7,1%) patients with gingivitis, 9 (12%) with chronic periodontitis and 3 (3,15%) healthy. By PCR, DNA of *A. actinomycetemcomitans* were detected in 23 (32,8%) patients with gingivitis, 20 (26,6%) with chronic periodontitis and 38 (40%) healthy individuals; and *F. nucleatum* 17 (24,3%) patients with gingivitis, 11 (14,6%) with periodontitis and 19 (20%) healthy. In association, microorganisms were detected in 23 (32,8%) patients with gingivitis, 40 (53,3%) with chronic periodontitis and 17 (17,8%) healthy. *A. actinomycetemcomitans* isolated from patients with gingivitis belonged to biotype I, II, IV, V, X, and serotypes a, c and e. In patients with periodontitis biotypes II, VI and X and serotypes a, b, and c were found and serotype c was the most predominant (80%); and healthy individuals biotypes II and X, and serotypes b and c. Quantitative values for *A. actinomycetemcomitans* in the three patients groups were ranged from 0 to 1.14×10^8 and *F. nucleatum* 0 to 3.98×10^6 . By AP-PCR heterogeneity of *A. actinomycetemcomitans* and *F. nucleatum* in the different clinical status was observed. These comparative results might be considered by dentists for the treatment of periodontal disease and its effective monitoring.

Keywords: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Fusobacterium nucleatum*. Subgingival biofilm. Gingivitis. Chronic periodontitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sorotipagem de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> por Multiplex-PCR	38
Figura 2 - Curvas-padrão e curvas de melting para <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 29523 (A) e <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 (B).....	39
Figura 3 - Dendrograma construído com o programa NTSYS com 70 cepas de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> obtidas de 23 pacientes com gengivite, 35 pacientes com periodontite crônica e 12 pacientes sadios.....	45
Figura 4 - Dendrograma construído com o programa NTSYS com 23 cepas de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> obtidas de sete pacientes com gengivite.....	46
Figura 5 - Dendrograma construído com o programa NTSYS com 35 cepas de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> obtidas de 13 pacientes com periodontite crônica.....	47
Figura 6 - Dendrograma construído com o programa NTSYS com 12 cepas de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> obtidas de oito pacientes sadios.....	48
Figura 7 - Dendrograma construído com o programa NTSYS com 51 cepas de <i>Fusobacterium nucleatum</i> obtidas de 18 pacientes com gengivite.....	52
Figura 8 - Dendrograma construído com o programa NTSYS com 62 cepas de <i>Fusobacterium nucleatum</i> obtidas de 29 pacientes com periodontite crônica.....	53
Figura 9 - Dendrograma construído com o programa NTSYS com 40 cepas de <i>Fusobacterium nucleatum</i> obtidas de 22 pacientes sadios.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores espécies-específicos usados na detecção qualitativa e quantitativa de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e <i>Fusobacterium nucleatum</i>	32
Tabela 2 - Características gerais dos pacientes com gengivite, periodontite crônica e indivíduos saudáveis.....	33
Tabela 3 - Prevalência de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e <i>Fusobacterium nucleatum</i> em pacientes com gengivite, periodontite crônica e indivíduos saudáveis.....	35
Tabela 4 - Distribuição geral dos biotipos e sorotipos de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> isolados de pacientes com gengivite (70), periodontite crônica (75) e indivíduos saudáveis (95).....	36
Tabela 5 - Relação entre biotipagem e sorotipagem de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	37
Tabela 6 - Determinação qualitativa por PCR convencional e quantitativa por PCR em tempo real de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e <i>Fusobacterium nucleatum</i> em pacientes com gengivite, periodontite crônica e indivíduos saudáveis.....	41
Tabela 7 - Características das cepas de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> com 100% de similaridade nos três quadros clínicos avaliados.....	42
Tabela 8 - Características das cepas de <i>Fusobacterium nucleatum</i> com 100% de similaridade nos três quadros clínicos avaliados.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - American Type Culture Collection
AP-PCR - Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide
bp - Base pair
CDT - Toxina distensora
CO₂ - Dióxido de carbono
DAF - DNA Amplification Fingerprinting
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
Eh - Potencial redox
H₂S - Sulfeto de hidrogênio
IL-1 β - Interleucina-1 beta
JP2 - Cepa leucotóxica de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
kDa - Kilo Dalton
LPS - Lipopolissacarídeo
Ltx - Leucotoxina
mm - Milímetro
mM - Milimolar
mL - Mililitro
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NTSYS - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
N₂ - Nitrogênio gasoso
ng - Nanograma
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis
qPCR - PCR quantitativo
RTX - Repeats in toxin
RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA
SM - Simple Matching
SYBR Green mix - Mistura de compostos para PCR quantitativa em tempo real

TSBV - Ágar de Soja Trypticaseína - Soro de cavalo - Bacitracina - Vancomicina

UFC - Unidade formadora de colônia

VMGA III - Viable Transport Medium Gothenburg

α - Alfa

μm - Micrometro

μL - Microlitro

$\mu\text{g/mL}$ - Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Seleção de Pacientes.....	27
3.1.1 Coleta dos espécimes clínicos.....	27
3.1.2 Isolamento e identificação bacteriana.....	28
3.1.3 Biotipagem das cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>.....	29
3.2 Detecção molecular das espécies bacterianas.....	29
3.2.1 Extração do DNA diretamente do material clínico e de colônias bacterianas em cultura pura.....	29
3.2.2 Detecção bacteriana.....	29
3.2.3 Sorotipagem das cepas de <i>A. actinomycetemcomitans</i>.....	29
3.3 Detecção bacteriana quantitativa por PCR em Tempo Real	30
3.3.1 Construção das curvas-padrão.....	30
3.3.2 Reação de PCR em Tempo Real.....	30
3.4 Tipagem <i>A. actinomycetemcomitans</i> e <i>F. nucleatum</i>.....	31
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A microbiota residente da cavidade bucal humana forma uma comunidade microbiana bastante complexa, a qual ainda não está totalmente caracterizada. Sabe-se que cerca de 700 espécies bacterianas estão presentes nos diversos ecossistemas bucais, apresentando acentuada variabilidade entre elas (OKUDA et al., 2012; STARKE et al., 2006). Essa microbiota pode sofrer desequilíbrio ecológico e alguns desses microrganismos podem ocasionar infecções periodontais, endodônticas e sistêmicas (SLOTS, 2007).

A maioria dos microrganismos que formam a microbiota residente da cavidade bucal permanece em íntimo contato com os tecidos periodontais (KOLEMBRANDER et al., 2010). Essa microbiota apresenta propriedades morfológicas, fisiológicas e genéticas que facilitam a colonização em sítios específicos, a coexistência com outros colonizadores, e podem inibir outros microrganismos competidores na formação do biofilme dental (BENÍTEZ-PÁEZ et al., 2014; HUANG et al., 2011; WARINNER et al., 2014).

Os ecossistemas da cavidade bucal tornam-se dinâmicos, promovendo assim, o equilíbrio da relação microbiota residente - meio ambiente - hospedeiro. Em casos de desequilíbrio microbiano observa-se a proliferação de alguns microrganismos, na sua maioria oportunistas, que em um hospedeiro imunocompetente poderão ser eliminados. Entretanto, em hospedeiros imunocomprometidos ou em casos de superpopulação microbiana esses microrganismos poderão ocasionar processos infecciosos sistêmicos (HAJISHENGALLIS, 2015).

A doença periodontal é caracterizada pela natureza polimicrobiana, pela inflamação crônica do tecido periodontal, mediada e modulada pela resposta do sistema imune do hospedeiro (ARMITAGE, 2004; DARVEAU, 2010). Algumas das bactérias periodontais são responsáveis por iniciar os processos infecciosos que acometem o periodonto, particularmente, espécies anaeróbias gram-negativas localizadas predominantemente no espaço subgengival (KATZ et al., 1999).

Estima-se que, aproximadamente 30 espécies bacterianas diferentes estão associadas à patogênese das doenças periodontais, dentre elas, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium*

nucleatum, *Dialister pneumosintes*, *Peptostreptococcus micros*, *P. magnus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium saphenum*, *E. nodatum*, *Mogibacterium timidum* e *Enterococcus faecalis* (RYLEY; KILIAN, 2009; TELES; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2006). Esses microrganismos subgengivais podem dar início ao desenvolvimento do processo de inflamação gengival, e promover a destruição do periodonto e do ligamento periodontal, assim como, a reabsorção do osso alveolar.

Na periodontite crônica a destruição tecidual está relacionada aos fatores etiológicos locais, tais como, a persistência da inflamação gengival e migração progressiva do epitélio em sentido apical, trazendo consequências, como a exposição do cemento e a formação de bolsa periodontal, aumento do fluido gengival, e perda gradativa das fibras colágenas do ligamento periodontal, resultando em reabsorção óssea progressiva (BOSSHARDT; STADLINGER; TERHEYDEN, 2015).

Em 1999, a Academia Americana de Periodontia reclassificou dentre as doenças periodontais, as gengivites induzidas ou não, pela presença do biofilme dental. Também, a expressão clínica de gengivite poderia ser substancialmente modificada por fatores sistêmicos tais como, alterações no sistema endócrino, uso de medicamentos, e desnutrição. Enquanto, a gengivite não induzida pelo biofilme dental envolve uma vasta gama dos distúrbios, onde muitas dessas alterações estão associadas à frequência e presença de microrganismos específicos como *Streptococcus*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Treponema pallidum*, entre outros; as gengivites de origem viral e fúngica; as de origem genética como fibromatose gengival hereditária; de origem sistêmica, ocasionadas por desordens mucocutâneas e reações alérgicas; e as de origem traumáticas (ARMITAGE, 1999).

Assim, as doenças periodontais foram classificadas de acordo com a velocidade da progressão e perda de inserção, sendo estabelecido, o termo periodontite agressiva (anteriormente periodontite de início precoce) e periodontite crônica (anteriormente periodontite do adulto), atualmente reconhecidas como formas distintas (ARMITAGE, 1999).

Dessa microbiota periodontal podem ser destacados *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* sendo considerados de importância pela participação na patogênese da doença periodontal, assim como em

processos infecciosos extra-orais (MALHEIROS; AVILA-CAMPOS, 2004).

Em 1878, Israel, descreveu o processo de actinomicose em humanos, produzido pelo *Actinomyces israelii* que estava acompanhado por bactérias gram-negativas cocoides e cocobacilares. Entretanto, somente em 1912, Kingler, descreveu pela primeira vez esse microrganismo “acompanhante” do *A. israelii*, como *Bacterium actinomycetemcomitans* sendo posteriormente descrito como pertencente ao gênero *Haemophilus* e *Pasteurella* (DEWHIRST et al., 1992), e finalmente, *Actinobacillus*; atualmente, é classificado como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (NORSKOV-LAURITSEN; KILIAN, 2006).

Desta forma, *A. actinomycetemcomitans* é caracterizado como cocobacilo gram-negativo, capnofílico, imóvel, não formador de esporos e pertencente à Família *Pasteurellaceae* (BERGEY, 1974). Em isolamento primário observam-se colônias translúcidas e fortemente aderentes ao meio de cultura de aproximadamente 0,5 a 1 mm de diâmetro, apresentando morfologia interna de estrela ou charutos cruzados. Em meio líquido apresenta-se aderido às paredes do tubo e sem turvar o meio de cultura (TOPLEY; WILSON, 1929).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans está associado a um grande número de doenças infecciosas, tais como endocardites, meningites, abscessos superficiais e profundos, septicemias e osteomielites, assim como também, às doenças periodontais, particularmente, à agressiva e crônica (TAN et al., 2002); podendo ser transmitido entre cônjuges (ZAMBON et al., 1983) e de pais para filhos (ASIKAINEN et al., 1996; PREUS et al., 1994).

Em função da fermentação da dextrina, maltose, manitol e xilose, *A. actinomycetemcomitans* pode ser classificado em dez biotipos (Slots et al., 1980), e a sua distribuição está relacionada à localização geográfica e às condições clínicas do paciente. Estudos realizados na população brasileira têm mostrado maior prevalência dos biotipos II e X nos quadros de periodontite, e os biotipos II, VI e X nos indivíduos periodontalmente sadios (AVILA-CAMPOS; CARVALHO; ZELANTE, 1995; GAETTI-JARDIM et al., 2008).

Cepas de *A. actinomycetemcomitans* também são classificadas em sete sorotipos diferentes (a-g), de acordo com a presença de antígenos polissacarídeos imunodominantes soro-específicos presentes em sua superfície celular (ROMAN-

TORRES et al., 2010). Estudos mostram que os sorotipos a, b, e c são prevalentes em indivíduos com processos periodontais (KAPLAN et al., 2002; ZAMBON et al., 1983). O sorotipo b está fortemente associado à periodontite agressiva (KAWAMOTO et al., 2009); o sorotipo c à periodontite crônica, e o sorotipo a ao periodonto saudável (ASIKAINEN et al., 1991).

Em 2010, Takada et al., descreveu o sorotipo g isolado de pacientes com periodontite crônica. Nos testes de biotipagem foi observada a fermentação de glicose, frutose, manose e maltose, e nos ensaios de citotoxicidade em células HL-60, este sorotipo g não demonstrou efeito citotóxico. Entretanto, na maioria das publicações esse sorotipo ainda é pouco relatado.

A literatura também mostra que a diversidade dos sorotipos está condicionada às diferentes formas de doença periodontal, às diferenças geográficas e étnicas das populações analisadas (ZAMBON et al., 1983), e que os diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* poderiam apresentar uma variabilidade com relação à virulência e à susceptibilidade às diversas drogas antimicrobianas (KAPLAN et al., 2001).

Segundo Zambon et al. (1988), a maioria dos indivíduos abriga um sorotipo predominante, que se mantém estável durante toda a vida; entretanto, Kim et al. (2009), afirmaram que alguns indivíduos podem ser colonizados por dois ou três sorotipos diferentes.

Os fatores de virulência de um microrganismo constituem atributos que podem colaborar na colonização de um ecossistema em particular no hospedeiro podendo atacar o sistema imune, e iniciando assim, o processo infeccioso (FIVES-TAYLOR et al., 1999).

Devido a sua participação nos processos periodontais, a presença de *A. actinomycetemcomitans* é considerada relevante nos estados de doença, pelo elevado número e pelos diversos fatores de virulência que produz, tais como, habilidade de aderir e de invadir os tecidos periodontais, capacidade de produzir leucotoxina destruindo células de defesa do hospedeiro, e produzir collagenases e bacteriocinas (LI et al., 2004; MEYER; FIVES-TAYLOR, 1997).

Dentre os fatores de virulência produzidos pelo *A. actinomycetemcomitans*

dois deles possuem propriedades citolíticas capazes de atuar em células humanas, a leucotoxina (Ltx) e a toxina distensora (CDT). A leucotoxina pertence à Família das toxinas RTX (refere-se às repetições de glicina e aspartato localizados na porção C terminal da toxina) (LALLY et al., 1996).

A produção da leucotoxina é codificada por um operon composto por quatro genes: *ltxA*, *ltxB*, *ltxC* e *ltxD*. O gene *ltxA* é o responsável por codificar a estrutura da toxina, sendo que os outros três genes *ltxB*, *ltxC* e *ltxD* são responsáveis por mediar a ativação e secreção da mesma. Cepas de *A. actinomycetemcomitans* altamente leucotóxicas possuem a deleção de 530 bp no promotor Ltx (BROGAN et al., 1994). Estudos têm mostrado a presença de *A. actinomycetemcomitans* leucotóxicas em pacientes com periodontite produzindo maior quantidade de leucotoxina que aquelas cepas isoladas de indivíduos periodontalmente saudáveis (ABERG et al., 2014; CLAEISSON et al., 2011; ZAMBON et al., 1983). Haubek et al. (1996) mostraram que a cepa *A. actinomycetemcomitans* JP2 altamente leucotóxica pertence ao sorotipo b.

A toxina distensora citolética (CDT) constitui-se uma proteína termolábil capaz de promover distensão celular provocando alterações morfológicas e que progressivamente evolui para a morte celular (BELIBASAKIS et al., 2012; DI RIENZO, 2014). Esta toxina também é capaz de agir sobre linhagens de células epiteliais derivadas de carcinoma bucal (DI RIENZO et al., 2002), em linfócitos T, como também, fibroblastos gengivais e periodontais (BELIBASAKIS et al., 2004; SHENKER et al., 2004).

Geneticamente, esta toxina é codificada por três genes, denominados *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, sendo que para a citotoxicidade é necessária a expressão conjunta deles (DI RIENZO et al., 2002; MAYER et al., 1999). O gene *cdtA* expressa uma proteína de 27 kDa, o gene *cdtB*, proteína de 30 kDa e o gene *cdtC*, proteína 20 kDa.

Esses genes *cdt* podem também estar presentes em algumas cepas de *Escherichia coli* (SCOTT; KAPER, 1994), *Shigella dysenteriae* (OKUDA et al., 1995), *Campylobacter jejuni* (PICKETT et al., 1994), *Haemophilus ducreyi* (COPE et al., 1997) e *Helicobacter hepaticus* (YOUNG et al., 2000).

A exposição de células eucarióticas à toxina CDT é letal, devido a sua capacidade de induzir a distensão celular, produzir a fragmentação da cromatina das

células alvo, bloquear o ciclo celular da célula eucariótica na fase G2 do ciclo celular, o qual encontra-se dividido em quatro fases sucessivas: G1, S, G2 e M, sendo que na fase G2 é realizada a síntese de DNA e o início da mitose (DI RIENZO et al., 2002), e conseqüentemente, promove a apoptose celular (SHENKER et al., 1999).

O gênero *Fusobacterium* constitui o segundo grupo microbiano anaeróbio mais frequentemente isolado da microbiota residente bucal humana e animal (KOLEMBRANDER et al., 2010; MOORE; MOORE, 1994). *Fusobacterium nucleatum* pertence à Família *Bacteroidaceae*, e a origem do gênero foi estabelecida de acordo com as características morfológicas observadas pelo microscópio óptico como células fusiformes, alongadas e com extremidades afiladas. O termo *nucleatum* foi designado de acordo com a aparência multinucleada devido à presença de grânulos intracelulares quando observadas em microscópio eletrônico (ROBRISH et al., 1987). Atualmente, o gênero *Fusobacterium* encontra-se dividido em 13 espécies, sendo *F. nucleatum* a mais frequentemente encontrada em seres humanos. Este grupo microbiano é apontado como heterogêneo, considerando que *F. nucleatum* apresenta cinco subespécies: *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, *F. nucleatum* subsp. *animalis*, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme*, e *F. nucleatum* subsp. *vincentii* (KOOK et al., 2013; PARK et al., 2013). Esta classificação foi realizada com base nos padrões de hibridização DNA-DNA, e nas comparações dos padrões eletroforéticos das enzimas glutamina desidrogenase e 2-oxoglutarato redutase, e pelas características fenotípicas observadas neste microrganismo (MORRIS et al., 1996).

A maioria das células de *F. nucleatum* apresenta de 5 a 10 µm de comprimento, e quanto às características morfocoloniais, apresentam-se como colônias convexas, lisas, com bordas irregulares e de 2 a 3 mm de diâmetro (BENNETT; DUERDEN, 1985). *Fusobacterium nucleatum* é isolado com frequência do sulco gengival e de saliva. Também, tem sido associado à doença periodontal e a outras infecções clínicas, como úlceras de pele, abscesso peritonsilar, abscesso de fígado, artrite, bacteremia, infecção intra-uterina, endocardite e infecção pulmonar (OGAWA et al., 2006; SIGNAT et al., 2011).

Apesar de ser uma bactéria anaeróbia estrita é possível observar seu crescimento na presença de até 6% de oxigênio, sendo capaz de sobreviver na exposição ao ar por até 100 minutos (LOESCHE, 1969).

Bartold et al. (1991), mostraram que produtos metabólicos produzidos pelo *F. nucleatum*, tais como ácido butírico, ácido acético e amônia eram capazes de inibir a multiplicação in vitro de fibroblastos e promover apoptose celular, sugerindo-se a participação desse microrganismo na patogênese da doença periodontal. *Fusobacterium nucleatum* apresenta capacidade adesiva às células eucarióticas, colonizando sítios específicos com a finalidade de obter nutrientes necessários para a sua sobrevivência, e desenvolver capacidade de tolerar variações bruscas do ecossistema como, pH, potencial redox (Eh), temperatura e pressão osmótica (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

Esse microrganismo também apresenta característica de co-agregação bacteriana constituindo-se em uma ponte de ligação entre os colonizadores iniciais e tardios do biofilme dental (SETTEM et al., 2012). Também, produz outras substâncias derivadas de seu metabolismo como, ácidos graxos voláteis, compostos sulfurosos (H₂S), indol e aminas que em elevada concentração agredem os tecidos do hospedeiro (BOLSTAD et al., 1996; CLAEISSON et al., 1990). Por outro lado, esse microrganismo produz substâncias antagônicas ou bacteriocinas que cumprem um importante papel ecológico, visando impedir a colonização de espécies competidoras, assim como, do autocontrole da sua população microbiana (HAFFAJEE et al., 1991).

Este microrganismo apresenta membrana externa, característica de bactérias gram-negativas formada por fosfolípidos, lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas. Dessas, o LPS apresenta atividade antigênica e imunológica semelhante ao LPS de *E. coli* podendo também induzir a mitose, alteração de células B, reabsorção óssea e produção de IL-1 β (HAMADA et al., 1988). Esse microrganismo secreta proteases responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo periodontal e pela ativação do sistema complemento. Essas proteases têm a capacidade de alterar a coagulação sanguínea, degradar proteínas como fibronectina e fibrinogênio, colágeno tipo I e IV, assim como degradar a α -imunoglobulina A, sendo usado como nutriente por vários patógenos periodontais (SCHENKEIN, 2006).

A maioria dos processos infecciosos que ocorrem na cavidade bucal é de natureza endógena, e a participação de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* é de importância, seja de forma individual ou em sinergismo (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005).

A detecção e identificação de bactérias periodontopatogênicas são geralmente realizadas por métodos de cultivo os quais, nem sempre apresentam adequada eficiência, sendo caros, demorados e requerem de treinamento prévio (D'ERCOLE et al., 2008). Por outro lado, a detecção molecular de microrganismos representa um meio rápido e eficaz para a identificação de patógenos, contribuindo para o estudo da relação parasito-hospedeiro, e auxiliando no esclarecimento dos aspectos taxonômicos microbianos. Nos últimos anos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo empregada com sucesso na detecção rápida e precisa de microrganismos patogênicos de diferentes origens (PASTER; DEWHIRST, 2009).

O método quantitativo de PCR em tempo real representa grande avanço no auxílio diagnóstico, devido à quantificação microbiana diretamente de amostras clínicas biológicas (BRANKATSKH et al., 2012). Métodos de tipificação bacteriana tais como, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Arbitrarily Primed - PCR (AP-PCR), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), DNA Amplification Fingerprinting (DAF), e endonuclease de restrição (REA), também têm sido usados para a análise da diversidade genética de microrganismos. Dentre eles, AP-PCR usando-se iniciadores arbitrários, se constitui um método simples, rápido e útil na análise epidemiológica de subtipos microbianos (HARALDSSON et al., 2004).

As técnicas moleculares representam ferramentas importantes na detecção e tipagem de patógenos periodontais a partir de espécimes clínicos, possibilitando a identificação rápida de microrganismos envolvidos em diversos processos infecciosos da cavidade bucal e consequentemente, colaborando para um melhor direcionamento do tratamento periodontal.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans e *Fusobacterium nucleatum* são bactérias bucais gram negativas e que estão implicadas no desenvolvimento e progressão da doença periodontal. A avaliação desses microrganismos em termos qualitativos e quantitativos torna-se relevante para melhor compreensão do papel que essas bactérias desempenham na etiologia, desenvolvimento e progressão dos processos periodontais, colaborando também, para a melhor definição dos aspectos ecológicos e de patogênese dos processos infecciosos que acometem o periodonto.

2 OBJETIVOS

Assim, devido à relevância desses microrganismos periodontais nos processos infecciosos da cavidade bucal, o presente estudo teve como objetivos:

1. Avaliar a ocorrência qualitativa e quantitativa de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* em pacientes com gengivite, com periodontite crônica e em indivíduos periodontalmente saudáveis;
2. Verificar a prevalência dos biotipos e sorotipos das cepas de *A. actinomycetemcomitans* isoladas; e
3. Avaliar a diversidade genética de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* isolados dos três quadros clínicos avaliados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção dos pacientes. Pacientes na faixa etária de 20 a 60 anos de idade, sem distinção de sexo ou raça, e apresentando no mínimo 14 dentes, foram selecionados na clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Em todos os pacientes foi realizado o exame clínico da cavidade bucal, por periodontista previamente treinado. O exame intrabucal foi realizado seguindo a metodologia preconizada por Armitage (1999), onde foram avaliadas as seguintes características clínicas, índice de placa bacteriana, presença ou ausência de sangramento, perda de inserção e profundidade clínica de sondagem.

Os pacientes foram agrupados em:

Grupo I, constituído por 70 pacientes com gengivite, apresentando sinais clínicos de inflamação gengival, eritema vermelho claro, perda da superfície pontilhada (mudança na textura da superfície gengival), recessão gengival, sem perda óssea alveolar, e com profundidade de sondagem ≤ 3 mm.

Grupo II, constituído por 75 pacientes com periodontite crônica, apresentando sinais clínicos e radiográficos de perda óssea alveolar, gengiva leve ou moderadamente inchada, papilas achatadas ou em forma de crateras, sangramento gengival espontâneo ou à sondagem, com alteração da coloração gengival, mobilidade dental leve, e com bolsa periodontal ≥ 5 mm de profundidade.

Grupo III, constituído por 95 indivíduos com saúde periodontal, apresentando gengiva inserida pontilhada com cor rósea coral, sem sangramento à sondagem, e com profundidade de sondagem ≤ 3 mm.

Para os três grupos de pacientes analisados, foram utilizados os seguintes critérios de exclusão, utilização de antibióticos três meses antes às coletas das amostras clínicas, estarem em tratamento periodontal, fumantes, totalmente desdentados ou com prótese, e portadores de doença sistêmica.

Todos os pacientes selecionados assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (Parecer No. 910/CEP).

3.1.1 Coleta dos espécimes clínicos. Inicialmente foi realizado o isolamento relativo com roletes de algodão, no elemento dentário selecionado e que

apresentasse maior quantidade de biofilme supragengival. Em seguida, este biofilme foi removido com gaze esterilizada. Em indivíduos sadios e com gengivite, a coleta foi realizada na face méso-vestibular dos primeiros molares superiores ou incisivos centrais superiores, e em pacientes com periodontite no sítio com maior profundidade subgengival de sondagem. O biofilme subgengival foi coletado com auxílio de dois cones esterilizados de papel absorvente (No. 30; Endopoints Ind. Com. Ltda., RJ, Brasil), os quais foram inseridos na região mais apical possível, no sulco gengival (nos indivíduos sadios e com gengivite), e na bolsa periodontal em indivíduos com periodontite, permanecendo por 60 segundos. Assim, um cone foi transferido para tubo contendo 3 mL de meio de transporte VMGA III (MÖLLER, 1966), e o outro cone transferido para 300 µL de TE buffer (GIBCO BRL), sendo transportados imediatamente para o laboratório.

3.1.2 Isolamento e identificação bacteriana. No laboratório os espécimes coletados foram dispersos por agitação em vortex. Alíquotas de 0,1 mL de diluições pré-estabelecidas (10^{-1} a 10^{-5}) foram transferidas, em duplicata, para meios seletivos ágar de soja tripticaseína - soro de cavalo - bacitracina - vancomicina (TSBV) e ágar Omata & Disraely. As placas inoculadas, em duplicata, foram incubadas em condições de anaerobiose (90% N₂/10% CO₂) a 37 °C, durante quatro dias.

Após o tempo de incubação foi realizada a identificação bacteriana respectiva, considerando-se as seguintes características na identificação de *A. actinomycetemcomitans* utilizando-se microscópio estereoscópico como, colônias de aproximadamente 1 mm de diâmetro e com aspecto interno característico em forma de estrela ou charutos cruzados, e com borda e superfície ligeiramente irregulares. Também, foi realizada a coloração de Gram, produção da catalase e fermentação de carboidratos segundo metodologia padronizada (AVILA-CAMPOS et al., 1988; SLOTS, 1982a).

A identificação de *F. nucleatum* foi realizada observando-se as características coloniais e celulares (coloração de Gram), produção da catalase, e fermentação de carboidratos (SLOTS, 1976). De cada crescimento dos respectivos meios de cultivo 3 a 4 colônias características de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* foram identificadas. Todas as cepas identificadas como *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* foram congeladas e estocadas em leite desnatado (10%; Difco Laboratories) à -80 °C.

3.1.3 Biotipagem das cepas de *A. actinomycetemcomitans*. As cepas de *A. actinomycetemcomitans* foram biotipadas segundo metodologia descrita por Slots et al. (1980), pela fermentação de dextrina, maltose, manitol e xilose.

3.2 Detecção molecular das espécies bacterianas.

3.2.1 Extração do DNA diretamente do material clínico e de colônias bacterianas em cultura pura. As amostras clínicas e as bactérias foram inicialmente dispersas por agitação, e concentradas por centrifugação (14.000 x g, 5 min). A extração do DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio, modificado por Avila-Campos et al. (1999). O DNA foi precipitado com etanol gelado (-20 °C) e mantido à - 80 °C, até o momento do uso. A concentração do DNA bacteriano foi determinada por espectrofotômetro (A_{260nm}/A_{280nm} = valores entre 1.8 a 2.0, determinaram a qualidade do DNA) correspondendo à concentração final de 1 ng. Também, 10 µL de cada DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) para a confirmação de sua integridade.

3.2.2 Detecção bacteriana. Foi realizada pela amplificação do DNA em volumes finais de 25 µL, contendo PCR buffer (10 X), $MgCl_2$ (50 mM), dNTP (0,2 mM), cada iniciador (0,4 µM), Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) e DNA (1 ng). As amplificações foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 9.700) programado para 1 ciclo de 94 °C (5 min); 30 ciclos de 94 °C (30 seg), 56 °C (30 seg) e 72 °C (30 seg) para *A. actinomycetemcomitans*. Para *F. nucleatum*, 1 ciclo de 94 °C (5 min); 30 ciclos de 94 °C (30 seg), 40 °C (30 seg) e 72 °C (30 seg); e finalmente, 1 ciclo de 72 °C (5 min) para extensão final do DNA. Os respectivos iniciadores espécies-específicos para cada bactéria estão descritos na Tabela 1. Como controles positivos, foram usados DNA das cepas de referência *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 e *F. nucleatum* ATCC 25586. Como controle negativo foi usado água em vez de DNA.

3.2.3 Sorotipagem das cepas de *A. actinomycetemcomitans*. A sorotipagem foi determinada por Multiplex-PCR (TEIXEIRA et al., 2006), com iniciadores específicos (Tabela 1). As reações de amplificação de DNA foram realizadas conforme mencionadas no item 3.2.2. O termociclador foi programado para 1 ciclo de 94 °C (5 min); 30 ciclos de 94 °C (30 seg), 52 °C (1 min) e 72 °C (1 min); e 1 ciclo de 72 °C (5 min) para extensão final do DNA. Como controles positivos foram utilizados DNA de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 (sorotipo a), *A. actinomycetemcomitans*

(sorotipo b) isolado de paciente com periodontite crônica no Laboratório de Anaeróbios, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384 (sorotipo c), e *A. actinomycetemcomitans* CU-1000 (sorotipo f), gentilmente cedida pelo Dr. Jeffrey Kaplan (Department of Oral Pathology, Biology and Diagnostic Sciences, New Jersey Dental School, Newark, New Jersey, USA). Como controle negativo foi usado água em vez de DNA. Foi usado 1-kb plus DNA ladder (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

Os produtos de DNA amplificados nos itens 3.2.2 e 3.2.3 foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) a 70 V por 2 h. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizado e fotografado sob transiluminador com luz UV com sistema Kodak Digital Science-120.

3.3 Detecção bacteriana quantitativa por PCR em Tempo Real.

3.3.1 Construção das curvas-padrão. As respectivas curvas-padrão foram determinadas utilizando-se as cepas de referência *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 e *F. nucleatum* ATCC 25586, considerando-se o valor de coeficiente de correlação ($R^2 > 0,99$). Inicialmente, as bactérias foram crescidas em caldo BHI incubadas em anaerobiose, a 37 °C, por 48 horas. O crescimento bacteriano foi padronizado (9.0×10^8 células/mL) pela escala 3 de McFarland. Assim, foram realizadas as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-10}), e de cada diluição 0,1 mL foi semeado em ágar sangue, sendo incubado em anaerobiose durante quatro dias. Desta forma, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) correspondentes a cada diluição foi determinado. Também, de cada diluição, 1 mL foi centrifugado e o sedimento utilizado para a extração de DNA (método fenol-clorofórmio).

A inclinação das curvas-padrão para todos os DNA das cepas de referência foi calculada por regressão linear em cada diluição pelo programa de detecção Rotor Gene 6000 (Rotor Gene Series Software 1.7). As curvas-padrão foram usadas para determinar o número de cópias de cada microrganismo pela amplificação de DNA em cada uma das amostras analisadas.

3.3.2 Reação de PCR em Tempo Real. Inicialmente, as sequências nucleotídicas dos iniciadores (Tabela 1) obtidas da literatura, foram analisadas pelos programas Net Primer (<http://www.premierbiosft.com/netprimer>), BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), e Primer Show (<http://bioinformatics.org/sms/>), para

confirmação da especificidade dos iniciadores, tamanho dos amplicons e formação de primers-dimers.

Nesta reação foi utilizado o sistema SYBR Green com volumes finais de 20 μL , contendo PCR Master Mix (2 X) (Promega) e iniciadores específicos para cada bactéria (100 μM) (Tabela 1). Foram usadas as seguintes condições de amplificação: 1 ciclo de 95 °C (2 min), 40 ciclos de 95 °C (45 seg), 60 °C (2 min) e temperatura de anelamento de 60 °C para *A. actinomycetemcomitans*; e 56 °C para *F. nucleatum*. As reações foram realizadas em duplicata, em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Australia).

3.4 Diversidade Genética (Tipagem) de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*. Foi determinada pela técnica de AP-PCR com cinco iniciadores arbitrários (Tabela 1). As amplificações de DNA foram realizadas em volumes finais de 25 μL , contendo água Milli-Q, PCR buffer (10 X), MgCl_2 (50 mM), dNTP (0,2 mM), iniciador (0,4 M), Platinum *Taq* DNA polimerase (0,5 U) e DNA (1 ng). O termociclador (Perkin Elmer) foi programado para 1 ciclo de 94 °C (5 min); 30 ciclos de 94 °C (1 min), 34 °C (1 min), 72 °C (2 min); e 1 ciclo de 72 °C (5 min) para extensão final do DNA. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) a 70 V, 2 h. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$), visualizado e fotografado sob transiluminador com luz UV com sistema Kodak Digital Science-120. Foi usado 1-kb plus DNA ladder (Invitrogen) como marcador de peso molecular. A partir da análise dos produtos amplificados, foram construídos dendrogramas com auxílio do programa Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) (Applied Biostatistics, Inc. Versão 1.7).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos neste estudo foram avaliados pelos testes do Qui-quadrado e de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dendrogramas foram construídos com o programa NTSYS (Applied Biostatistics, Inc. versão 1.7). Para *A. actinomycetemcomitans* foi utilizado o Coeficiente de similaridade de Jaccard e para *F. nucleatum* o Coeficiente de SM (Simple Matching).

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na detecção qualitativa e quantitativa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*.

Iniciadores	Sequência (5'→ 3')	Produto (bp)	Referências
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>			
<u>PCR Convencional</u>			
	AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT	557	Ashimoto et al. (1996)
<u>Multiplex-PCR (Sorotipagem)</u>			
SA-F SA-R	GCA ATG ATG TAT TGT CTT CTT TTG GA CTT CAG TTG AAT GGG GAT TGA CTA AAA C	428	Teixeira et al. (2006)
SB-F SB-R	CGG AAA TGG AAT GCT TGC CTG AGG AAG CCT AGC AAT	298	
SC-F SC-R	AAT GAC TGC TGT CGG AGT CGC TGA AGG TAA TGT CAG	559	
SD-F SD-R	TTA CCA GGT GTC TAG TCG GA GGC TCC TGA CAA CAT TGG AT	690	
SE-F SE-R	CGT AAG CAG AAG AAT AGT AAA CGT AAT AAC GAT GGC ACA TCA GAC TTT	211	
SF-F SF-R	ARA AYT TYT CWT CGG GAA TG CCT TTA TCA ATC CAG ACA GC	232	
<u>PCR Quantitativo</u>			
	CCC ATC GCT GGT TGG TTA GGC ACG TAG GCG GAC C	696	Kuboniwa et al. (2004)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>			
<u>PCR Convencional</u>			
5059S	ATT GGG CTA AAA ATT ATA GTT ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G	1010	Avila-Campos et al. (1999)
<u>PCR Quantitativo</u>			
	CTT AGG AAT GAG ACA GAG ATG TGA TGG TAA CAT ACG AAA GG	120	Periasamy et al. (2009)
<u>Iniciadores arbitrários (Tipagem)</u>			
OPA-03	AGT CAG CCA C		Chen et al. (1994)
OPA-05	AGG GGT CTT G		Chen et al. (1994)
OPA-07	GAA ACG GGT G		Chen et al. (1994)
OPA-13	CGG CAC CCA C		Chen et al. (1994)
OPA-17	GAC CGT CTT GT		Chen et al. (1994)

5 RESULTADOS

Neste estudo foram avaliados 240 pacientes, sendo 70 com gengivite, 75 com periodontite crônica e 95 saudáveis. As características gerais dos pacientes analisados segundo o quadro clínico, sexo, faixa etária e profundidade clínica de sondagem podem ser observadas na Tabela 2. Nos pacientes analisados foi notada a relação entre a presença da doença periodontal com a progressão da idade, mostrando valores estatisticamente significativos ($p < 0,001$). Também, em relação à profundidade clínica de sondagem foram determinadas as medianas nos respectivos quadros clínicos de gengivite (mediana = 3,0), periodontite crônica (mediana = 6,0), e saudável (mediana = 2,0) (Tabela 2).

Tabela 2 – Características gerais dos pacientes com gengivite, periodontite crônica e indivíduos saudáveis.

Pacientes	Sexo	Idade em anos	PCS
Quadro clínico	M/F	Média ± DP	Média ± DP
(No.)		(Mediana)	(Mediana)
Gengivite	26/44	37,0 ± 13,6	2,9 ± 0,3
(70)		(34,5)	(3,0)
Periodontite crônica	38/37	46,5 ± 9,0	5,9 ± 0,8
(75)		(47,0)	(6,0)
Saudável	33/62	29,9 ± 9,7	1,7 ± 0,6
(95)		(27,0)	(2,0)

M/F: Masculino/ Feminino. PCS: Profundidade Clínica de Sondagem, em mm.

DP: Desvio Padrão.

Foi usado o Teste Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ (estatisticamente significativos).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans foi isolado em 2 (2,8%) pacientes com gengivite, 4 (5,3%) com periodontite crônica e 5 (5,26%) indivíduos saudáveis; e *F. nucleatum* em 13 (18,6%) dos pacientes com gengivite, 20 (26,6%) com periodontite crônica e 19 (20%) saudáveis. Ambos os microrganismos foram encontrados em associação em 5 (7,1%) pacientes com gengivite, 9 (12%) com periodontite crônica e 3 (3,15%) pacientes saudáveis (Tabela 3). Nessa mesma Tabela 3, também se observa a detecção do DNA por PCR desses microrganismos. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 23 (32,8%) pacientes com gengivite, 20 (26,6%) com periodontite crônica e 38 (40%) indivíduos saudáveis; e *F. nucleatum* em 17 (24,3%) pacientes com gengivite, 11 (14,6%) com periodontite crônica e 19 (20%) indivíduos saudáveis. Esses microrganismos estavam em associação, em 23 (32,8%) pacientes com gengivite, 40 (53,3%) com periodontite crônica e 17 (17,8%) saudáveis.

Na Tabela 4 pode ser observada a distribuição geral dos biotipos e sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* isolados de indivíduos com gengivite, periodontites crônica e saudável. Dos 23 isolados de pacientes com gengivite foram encontrados cinco biotipos (I, II, IV, V e X), e três sorotipos (a, c, e e). Dos 13 pacientes com periodontite crônica foram recuperados 35 isolados, sendo identificados três biotipos (II, VI e X), e três sorotipos (a, b, e c); e dos 8 indivíduos saudáveis, os 12 isolados foram distribuídos em dois biotipos (II e X) e dois sorotipos (b e c).

Na Tabela 5 pode ser observada a relação entre os diferentes biotipos e sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* encontrados em cada condição clínica analisada. Nos pacientes com gengivite o biotipo X e os sorotipos c e e foram os mais prevalentes. Nos pacientes com periodontite crônica, o biotipo X e o sorotipo c foram encontrados em maior prevalência, e em indivíduos saudáveis, observou-se uma distribuição homogênea dos biotipos II e X e do sorotipo c.

Na Figura 1 observa-se o gel de eletroforese mostrando os produtos de PCR na detecção dos diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*. Nenhum dos 70 *A. actinomycetemcomitans* avaliados pertenceu aos sorotipos d ou f.

Tabela 3 – Prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* em pacientes com gengivite, periodontite crônica e indivíduos saudáveis.

Pacientes	Bactéria	Métodos de detecção			
		Cultura		PCR	
		No.	(%)	No.	(%)
Gengivite (70)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2	(2,8%)	23	(32,8%) ^b
	<i>F. nucleatum</i>	13	(18,6%) ^a	17	(24,3%)
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> / <i>F. nucleatum</i>	5	(7,1%)	23	(32,8%)
	Total	20	(28,5%)	63	(90%)
Periodontite crônica (75)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	4	(5,3%)	20	(26,6%) ^b
	<i>F. nucleatum</i>	20	(26,6%) ^a	11	(14,6%)
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> / <i>F. nucleatum</i>	9	(12%)	40	(53,3%)
	Total	33	(44%)	71	(94,5%)
Saudável (95)	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5	(5,26%)	38	(40%) ^{bcd}
	<i>F. nucleatum</i>	19	(20%) ^a	19	(20%)
	<i>A. actinomycetemcomitans</i> / <i>F. nucleatum</i>	3	(3,15%)	17	(17,8%)
	Total	27	(28,4%)	74	(77,8%)

Foi usado o Teste do Qui-quadrado (X^2). Valores de $p < 0,05$ (estatisticamente significativo).

^adetecção de *F. nucleatum* por cultura independe do grupo ($p = 0,01$).

^bdetecção de *A. actinomycetemcomitans* por PCR independe da presença de *F. nucleatum* por PCR ($p = 0,01$).

^cdetecção de *A. actinomycetemcomitans* por PCR foi significativa no grupo de indivíduos saudáveis ($p = 0,005$).

^ddiferença significativa do grupo de pacientes saudáveis comparado ao grupo de pacientes periodontite crônica ($p = 0,005$).

Tabela 4 - Distribuição geral dos biotipos e sorotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolados de pacientes com gengivite (70), periodontite crônica (75), e indivíduos sadios (95).

Pacientes Positivos (No.)	Isolados (No.)	Biotipos						Sorotipos			
		No. (%)						No. (%)			
		I	II ^a	IV	V	VI	X	a	b	c ^a	e
Gengivite (7)	23	2 (9%)	3 (13%)	2 (9%)	3 (13%)	0	13 (56%)	2 (8,7%)	0	11 (47,8%)	10 (43,5%)
Periodontite crônica (13)	35	0	14 (40%)	0	0	1 (3%)	20 (57%)	2 (6%)	5 (14%)	28 (80%)	0
Sadios (8)	12	0	7 (58%)	0	0	0	5 (42%)	0	2 (17%)	10 (83%)	0

Foi usado o Teste do Qui-quadrado (X^2). Valores de $p < 0,05$ (valores estatisticamente significativos).

^aGengivite $\neq$ Periodontite crônica e Gengivite $\neq$ Sadios; $p < 0,05$, em relação ao biotipo II e sorotipo c.

Não foram detectados os biotipos III, VII, VIII e IX, nem os sorotipos d e f.

Tabela 5 – Relação entre biotipagem e sorotipagem de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Características clínicas		Biotipos						Total
Sorotipos		I	II	IV	V	VI	X	
Gengivite								
a		0	0	0	0	0	2	2
c		1	2	1	2	0	5	11
e		1	1	1	1	0	6	10
Total		2	3	2	3	0	13	23
Periodontite crônica								
a		0	2	0	0	0	0	2
b		0	3	0	0	0	2	5
c		0	9	0	0	1	18	28
Total		0	14	0	0	1	20	35
Sadio								
b		0	2	0	0	0	0	2
c		0	5	0	0	0	5	10
Total		0	7	0	0	0	5	12

Não foram detectados os biotipos III, VII, VIII e IX, nem os sorotipos d e f.

Figura 1 – Sorotipagem de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pela técnica de Multiplex-PCR

Eletroforese em gel de agarose: coluna 1, *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a (paciente com gengivite); coluna 2, *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b (paciente com periodontite); coluna 3, sorotipo c (paciente com periodontite); coluna 4, sorotipo e (paciente com gengivite); coluna 5, marcador 1-kb plus DNA ladder.

Na Figura 2 estão ilustradas as curvas-padrão e curvas de melting determinadas para detectar o DNA bacteriano de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* pelo PCR quantitativo com o sistema SYBR Green. Na Figura 2A observam-se, respectivamente, ambas as curvas para *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523, e na Figura 2B as curvas para *F. nucleatum* ATCC 25586.

Figura 2 - Curvas-padrão e curvas de melting para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523 (A) e *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (B).

Na Tabela 6 observam-se as prevalências de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum*, respectivamente, obtidas pelos métodos de detecção por PCR convencional e PCR em tempo real. Por PCR convencional, *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 65,7% dos 70 pacientes com gengivite, 80% dos 75 pacientes com periodontite, e 57,8% dos 95 indivíduos saudáveis. *Fusobacterium nucleatum* foi observado, em 57,1% dos pacientes com gengivite, 68% dos pacientes com periodontite, e 37,8% dos indivíduos saudáveis. Enquanto que, por PCR em tempo real, foi possível observar a presença de *A.*

actinomycescomitans em 71,4% dos pacientes com gengivite, 92% com periodontite, e 65,2% dos indivíduos saudáveis analisados. *Fusobacterium nucleatum* foi detectado em 74,2% com gengivite, 90,6% com periodontite e em 51,5% dos saudáveis. Nesta Tabela 6, observamos também, a faixa dos valores quantitativos do número de cópias bacterianas com valores mínimos e máximos detectados, assim como, os valores da mediana em pacientes com gengivite, periodontite crônica e indivíduos saudáveis. Para *A. actinomycescomitans* foi possível observar valores quantitativos variando de 0 a $1,14 \times 10^8$, e para *F. nucleatum* de 0 a $3,98 \times 10^6$. Também, foram obtidos os valores da mediana para *A. actinomycescomitans* em pacientes com gengivite ($2,2 \times 10^2$), periodontite crônica ($1,5 \times 10^5$), e saudáveis ($0,6 \times 10^1$); assim como, para *F. nucleatum* em pacientes com gengivite ($7,3 \times 10^1$), periodontite crônica ($4,0 \times 10^2$) e saudáveis (0,0).

O Teste estatístico de Kruskal-Wallis foi utilizado para observar as diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes com gengivite, periodontite crônica e saudáveis em relação à quantificação bacteriana. Para *A. actinomycescomitans* foram observadas diferenças estatísticas nos grupos com gengivite e periodontite em relação ao grupo saudável ($p < 0,05$), entretanto, a análise entre os três grupos avaliados mostrou valores estatisticamente significativos ($p < 0,002$). Esses resultados foram similares ($p < 0,001$) (Tabela 6).

A correlação de ambos os microrganismos nos grupos de indivíduos com gengivite, periodontite crônica e saudáveis foi determinada pelo Teste de Spearman determinando-se a respectiva Correlação de Spearman (rS), sendo $rS = -0,2 - 0$ (nula); $rS = 0,21 - 0,40$ (fraca); $rS = 0,41 - 0,60$ (moderada); $rS = 0,61 - 0,8$ (forte); $rS > 0,81$ (perfeita), e $p < 0,05$. Nos três grupos avaliados, não foram obtidas correlações lineares significativas para *A. actinomycescomitans* e *F. nucleatum*. O grupo de pacientes com gengivite apresentou $rS = 0,096$ e $p = 0,426$; nos pacientes com periodontite crônica foi observado $rS = 0,082$ e $p = 0,483$; e em saudáveis $rS = -0,099$ e $p = 0,338$.

Tabela 6 – Determinação qualitativa (PCR convencional) e quantitativa (PCR em tempo real) de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* em pacientes com gengivite, periodontite crônica e indivíduos saudáveis.

Bactérias	Quadro Clínico	PCR convencional		PCR em tempo real		No. de cópias de DNA/μL		
		Amostras Positivas		Amostras Positivas		Faixa de valores	Mediana [desvio interquartílico]	p
		No.	%	No.	%			
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Gengivite (70)	46	65,7	50	71,4	0 - 1,14 x 10 ⁸	2,2 x 10 ² [2,5 x 10 ³] ^a	p < 0,002
	Periodontite (75)	60	80,0	69	92,0	0 - 1,08 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁵ [9,9 x 10 ⁵] ^a	
	Saudável (95)	55	57,8	62	65,2	0 - 9,43 x 10 ⁴	0,6 x 10 ¹ [1,1 x 10 ²]	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Gengivite (70)	40	57,1	52	74,2	0 - 1,86 x 10 ⁶	7,3 x 10 ¹ [2,2 x 10 ³] ^b	p < 0,001
	Periodontite (75)	51	68,0	68	90,6	0 - 3,98 x 10 ⁶	4,0 x 10 ² [3,8 x 10 ⁴] ^b	
	Saudável (95)	36	37,8	49	51,5	0 - 2,63 x 10 ⁵	0,0 [1,8 x 10 ²]	

Foi usado o Teste Kruskal-Wallis. Valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans = ^aGengivite ≠ Sadio e Periodontite ≠ Sadio; *Fusobacterium nucleatum* = ^bGengivite ≠ Sadio e Periodontite ≠ Sadio.

Na Tabela 7 observam-se os grupos genéticos de cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* com 100% de similaridade e suas características de biotipagem e sorotipagem associadas aos quadros clínicos dos pacientes avaliados, conforme ilustrado na Figura 3.

Tabela 7 - Características das cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* com 100% de similaridade nos três quadros clínicos avaliados.

Sexo do Paciente	Profundidade à Sondagem	Cepa	Biotipo	Sorotipo	Grupo Genético
M	3 mm	15G	X	e	VIII
M	2 mm	34S	II	c	
M	2 mm	35S	II	c	
F	3 mm	5S	X	b	XVIII
F	3 mm	6S	X	b	
M	3 mm	27G	I	c	XXII
M	3 mm	28G	I	c	
M	3 mm	29G	I	a	XXIII
M	3 mm	30G	X	c	
M	5 mm	43P	II	c	XXV
M	7 mm	57P	X	c	
F	7 mm	68P	X	c	
M	7 mm	69P	X	c	
F	7 mm	45P	II	c	XXVI
F	7 mm	46P	II	c	
F	7 mm	47P	II	c	
M	6 mm	48P	X	b	
M	6 mm	36P	VI	c	XXVII
M	7 mm	52P	X	c	
M	7 mm	58P	X	c	
F	6 mm	62P	X	c	
M	3 mm	24G	V	c	XXVIII
F	7 mm	63P	II	c	
F	5 mm	41P	X	c	XXIX
F	6 mm	56P	X	b	
F	6 mm	59P	II	a	
F	6 mm	61P	X	c	
M	7 mm	70P	X	c	
M	7 mm	53P	X	c	XXXI
M	7 mm	54P	II	c	
F	6 mm	55P	X	c	
F	2 mm	7S	II	c	XXXII
M	6 mm	51P	II	c	
F	3 mm	17S	X	c	XXXVIII
M	3 mm	18G	X	e	
F	3 mm	25G	IV	c	
F	6 mm	37P	II	c	
M	6 mm	49P	II	b	
F	5 mm	66P	II	c	
F	5 mm	67P	X	c	

G: Gengivite; P: Periodontite crônica; S: Sadio;

M/F= Masculino/Feminino.

Na Figura 3 observa-se o dendrograma geral construído com os 70 *A. actinomycetemcomitans* obtidos dos pacientes com gengivite, periodontite crônica, e saudáveis. A análise genotípica das cepas analisadas pela utilização da técnica AP-PCR mostrou a amplificação de bandas nítidas quando o iniciador OPA-3 foi utilizado. Assim, as cepas de *A. actinomycetemcomitans* foram agrupadas em 41 grupos genéticos com 75% de similaridade. Desses, podem ser destacados 12 grupos (marcados em vermelho) abrigando mais de uma cepa com 100% de similaridade.

As cepas de referência utilizadas mostraram que *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 (Aa), *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (Bf) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Ec), foram agrupadas individualmente mostrando diferenças genéticas. Sendo assim, essas cepas de referência, formaram respectivamente, os grupos I, XIX e XX. Também, é possível notar na Figura 3 que *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 ficou distante dos outros *A. actinomycetemcomitans* isolados dos três grupos de pacientes avaliados.

Para melhor visualizar as agrupações genéticas obtidas com *A. actinomycetemcomitans* nos diferentes grupos de pacientes, foram realizadas análises comparativas segundo as características clínicas; entretanto, não foi possível observar alguma associação entre o sexo dos pacientes, a profundidade clínica à sondagem, biotipos e sorotipos, notando-se uma distribuição heterogênea deste microrganismo (Tabela 8). Assim, na Figura 4, observa-se o dendrograma obtido com 23 *A. actinomycetemcomitans* isolados de pacientes com gengivite. Foram formados 20 grupos genéticos, sendo que três deles (grupos XIII B, XVI e XVIII) abrigaram cepas com 100% de similaridade. Também, as três cepas de referência utilizadas foram agrupadas de maneira distintas, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 (Aa) no grupo I, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 (Bf) no grupo XI e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Ec) no grupo XII, observando-se a ausência de relação genética entre elas.

Na Figura 5 observam-se os 35 *A. actinomycetemcomitans* de pacientes com periodontite crônica, os quais foram agrupados em 20 grupos com 80% de similaridade, sendo que 24 *A. actinomycetemcomitans* apresentaram 100% de similaridade e foram agrupados em seis grupos genéticos (IV, VI, VII, VIII, XI e XII). As cepas de referência foram agrupadas em três grupos distintos, *A.*

actinomycescomitans ATCC 29523 (Aa) no grupo I, *E. coli* ATCC 25922 (Ec) no grupo III e *B. fragilis* ATCC 25285 (Bf) no grupo XX.

Na Figura 6 é possível notar a distribuição dos 12 *A. actinomycescomitans* obtidos de pacientes sadios, onde pode ser observada a formação de 11 grupos genéticos com 75% de similaridade. O grupo IV foi formado por duas cepas pertencentes a um mesmo indivíduo, e com características fenotípicas e genotípicas semelhantes. O grupo genético XI foi dividido em dois subgrupos A e B, sendo que o subgrupo B foi formado pelos isolados 5S e 6S, que ao lado do isolado 4S do subgrupo A foram obtidos de um mesmo paciente.

As cepas de referência utilizadas formaram grupos diferentes, *A. actinomycescomitans* ATCC 29523 no grupo I (Aa), *B. fragilis* ATCC 25285 (Bf) no grupo V e *E. coli* ATCC 25922 (Ec) no grupo IX.

Figura 4 – Dendrograma construído com o programa NTSYS (Applied Biostatistic, Inc. Versão 1.7) com 23 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de sete pacientes com gengivite (G). A análise foi realizada pelo Coeficiente de Jaccard. Observa-se a formação de 20 grupos genéticos e três deles formados por cepas com 100% de similaridade (marcados em vermelho). Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523 ; Bf: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285; Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922. Características dos isolados: I, II, IV, V, X (Biotipos); a, c, e (Sorotipos); F (Sexo feminino); M (Sexo masculino); 3 mm (Profundidade clínica à sondagem).

Figura 5 – Dendrograma construído com o programa NTSYS (Applied Biostatistic, Inc. Versão 1.7) com 35 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de 13 pacientes com periodontite crônica (P). A análise foi realizada pelo Coeficiente de Jaccard. Observa-se a formação de 20 grupos genéticos e seis deles formados por cepas com 100% de similaridade (marcados em vermelho). Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523; Bf: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285; Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922. Características dos isolados: I, VI, X (Biotipos); a, b, c (Sorotipos); F (Sexo feminino); M (Sexo masculino); 5 mm, 6 mm, 7 mm (Profundidade clínica à sondagem).

Figura 6 – Dendrograma construído com o programa NTSYS (Applied Biostatistic, Inc. Versão 1.7) com 12 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de oito pacientes sadios (S). A análise foi realizada pelo Coeficiente de Jaccard. Observa-se a formação de 11 grupos genéticos e dois deles formados por cepas com 100% de similaridade (marcados em vermelho). Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523; Bf: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285; Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922. Características dos isolados: II, X (Biotipos); b, c (Sorotipos); F (Sexo feminino); M (Sexo masculino); 1mm, 2mm, 3mm (Profundidade clínica à sondagem).

Na tipagem das cepas de *F. nucleatum* com os cinco iniciadores avaliados (Tabela 1), o iniciador OPA-5 foi selecionado pela produção de bandas nítidas. Da mesma forma, foram construídos os respectivos dendrogramas para cada grupo de pacientes. Também, as cepas de referência *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523, *B. fragilis* ATCC 25285 e *F. nucleatum* ATCC 25586 foram usadas nas análises.

Para melhor visualização, na Tabela 8 foram descritas as características dos grupos genéticos formados por *F. nucleatum* apresentando 100% de similaridade em cada grupo de indivíduos avaliados.

Na Figura 7 é possível notar a distribuição dos 51 *F. nucleatum* obtidos de pacientes com gengivite, onde podem ser observados nove grupos genéticos, com 78% de similaridade. O grupo genético II subgrupo A2a1b1 foi formado pelos isolados 4G e 14G (marcados em vermelho), ambos obtidos de pacientes diferentes e apresentaram características fenotípicas e genotípicas semelhantes. Também, neste mesmo grupo II foi observado que o subgrupo B2b foi composto pelos isolados 9G e 10G, e o grupo genético IV subgrupo A2, abrigaram os isolados 49G e 50G que foram oriundos, respectivamente, de indivíduos do sexo masculino e feminino, mas que também, apresentaram características semelhantes, como a profundidade à sondagem de 3 mm.

Na Figura 8 observa-se a distribuição dos 62 *F. nucleatum* obtidos de pacientes com periodontite crônica, onde podem ser notados 20 grupos genéticos com 86% de similaridade entre os isolados bacterianos. Os grupos II A1b, X A, XIV A, XV A2, XVI A1b, XVI A2, XVI B, XVII A e XVII B1a2a, B2a, B2ba e B2bb agruparam cepas com 100% de similaridade.

Na Figura 9 pode ser observada a formação 16 grupos com 85% de similaridade entre os isolados obtidos de indivíduos saudáveis, notando-se no grupo II subgrupo A2a, isolados com 100% de similaridade. Curiosamente, nesse subgrupo os isolados agrupados pertenceram a indivíduos distintos.

Tabela 8 - Características das cepas de *Fusobacterium nucleatum* com 100% de similaridade nos três quadros clínicos avaliados.

Quadro	Profundidade à	Sexo	Cepa	Grupo	Subgrupo
Clínico	Sondagem			Genético	Genético
Gengivite	3 mm	M	4G	II	A2a1b1
	3 mm	F	14G	II	A2a1b1
	3 mm	M	9G	II	B2b
	3 mm	M	10G	II	B2b
	3 mm	M	49G	IV	A2
	3 mm	F	50G	IV	A2
Periodontite crônica	5 mm	M	11P	II	A1b
	5 mm	M	12P	II	A1b
	5 mm	M	16P	X	A
	5 mm	M	17P	X	A
	5 mm	F	21P	XIV	A
	5 mm	F	22P	XIV	A
	5 mm	M	31P	XV	A2
	5 mm	M	32P	XV	A2
	6 mm	M	36P	XVI	A1b
	5 mm	F	45P	XVI	A1b
	5 mm	F	43P	XVI	A2
	6 mm	M	46P	XVI	A2
	5 mm	F	51P	XVI	B
	5 mm	M	54P	XVI	B
	5 mm	M	55P	XVII	A
	5 mm	M	56P	XVII	A
	6 mm	F	27P	XVII	B1a2a
	5 mm	M	57P	XVII	B1a2a
	5 mm	M	58P	XVII	B1a2a
	6 mm	F	42P	XVII	B2a
	5 mm	M	61P	XVII	B2a
	5 mm	F	30P	XVII	B2ba
	6 mm	F	34P	XVII	B2ba
	5 mm	M	59P	XVII	B2bb
	5 mm	M	60P	XVII	B2bb
Sadios	2 mm	F	2S	II	A2a1a
	2 mm	M	39S	II	A2a1a
	2 mm	F	21S	II	A2a1b
	2 mm	M	26S	II	A2a1b
	2 mm	F	3S	II	A2a2a
	2 mm	M	14S	II	A2a2a

G: Gengivite; P: Periodontite crônica; S: Sadios.

mm: milímetro

M/F= Masculino/Feminino.

As cepas de referências utilizadas foram agrupadas isoladamente em todos os dendrogramas de *F. nucleatum*. Da mesma forma, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 agrupou-se em todos os dendrogramas no grupo genético I. No dendrograma de indivíduos com gengivite (Figura 7) *B. fragilis* ATCC 25285 foi agrupado no grupo VII e *F. nucleatum* ATCC 25586 no grupo VIII. No dendrograma dos isolados de indivíduos com periodontite crônica (Figura 8) *B. fragilis* ATCC 25285 agrupou-se no grupo XIX e *F. nucleatum* ATCC 25586 no grupo XX. No dendrograma com isolados de indivíduos sadios (Figura 9) *F. nucleatum* ATCC 25586 formou o grupo VII, enquanto, *B. fragilis* ATCC 25285 formou o grupo XVI.

Neste estudo a análise dos resultados obtidos pelo AP-PCR foi realizada pelo coeficiente de Jaccard e Sm (Simple Matching) (MEYERS et al., 2004). Para as análises de *A. actinomycetemcomitans* foi escolhido o coeficiente de Jaccard, enquanto que, para *F. nucleatum* foi selecionado o coeficiente de SM, devido a que, com o uso destes coeficientes conseguiu-se obter um melhor alinhamento dos grupos genéticos em ambos os microrganismos.

Figura 7 – Dendrograma construído com o programa NTSYS (Applied Biostatistic, Inc. Versão 1.7) com 51 *Fusobacterium nucleatum* de 18 pacientes com gengivite (G). A análise foi realizada pelo Coeficiente de SM (Simple Matching). Observa-se a formação de nove grupos genéticos e três deles formados por cepas com 100% de similaridade (marcados em vermelho). Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523; Bf: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e Fn: *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

Figura 8 – Dendrograma construído com o programa NTSYS (Applied Biostatistic, Inc. Versão 1.7) com 62 *Fusobacterium nucleatum* de 29 pacientes com periodontite crônica (P). A análise foi realizada pelo Coeficiente de SM (Simple Matching). Observa-se a formação de 20 grupos genéticos e 12 deles formados por cepas com 100% de similaridade (marcados em vermelho). Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523; Bf: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285; *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

Figura 9 – Dendrograma construído com o programa NTSYS (Applied Biostatistic, Inc. Versão 1.7) com 40 *Fusobacterium nucleatum* de 22 pacientes sadios (S). A análise foi realizada pelo Coeficiente de SM (Simple Matching). Observa-se a formação de 16 grupos genéticos e três deles formados por cepas com 100% de similaridade (marcados em vermelho). Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523; Bf: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285; *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

6 DISCUSSÃO

A doença periodontal é caracterizada como infecção polimicrobiana de elevada prevalência e incidência, constituindo-se um sério problema de saúde bucal para o homem, e acometendo populações no mundo inteiro (JIN et al., 2011). Estudos têm relatado que as infecções periodontais não seriam causadas simplesmente pelo aumento do biofilme dental, e sim pela associação com diversos membros da comunidade microbiana da cavidade bucal (ARMITAGE; ROBERTSON, 2009; KILIAN et al., 2006).

Essas doenças estão associadas à relevante presença de microrganismos, tais como *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* no biofilme subgengival; no entanto, ambos os microrganismos podem estar presentes nas diferentes condições clínicas bucais. Esses microrganismos são responsáveis pela produção de vários fatores de virulência, os quais estão envolvidos na colonização da cavidade bucal, e na invasão e destruição dos tecidos periodontais, assim como também, apresentam capacidade de atuar sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro (BOLSTAD et al., 1996; FIVES-TAYLOR et al., 1999; GENCO, 1992).

Pelas características gerais dos pacientes analisados, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as idades dos pacientes nos três grupos clínicos (gengivite, periodontite crônica e saudável), assim como também, a maior associação do aumento da idade com a periodontite crônica (Tabela 2).

Sabe-se que, a doença periodontal é de caráter multifatorial, onde alterações mecânicas, sistêmicas, fisiológicas, nutricionais e distúrbios endócrinos, entre outros, estariam associados à susceptibilidade do hospedeiro e à composição da microbiota bucal (ARMITAGE; ROBERTSON, 2009).

Estudos têm sugerido que a microbiota bucal associada a indivíduos saudáveis seria constituída principalmente por bactérias gram-positivas, com cerca de 15% de bacilos gram-negativos (HAFFAJEE et al., 1998; SLOTS, 1977; TANNER et al., 1998). Entretanto, outros estudos avaliaram também a microbiota de indivíduos saudáveis, onde foi notada a elevada presença de espécies gram-negativas (45%), incluindo *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, e *Eikenella corrodens* (AVILA, OJICIUS, YILMAZ, 2009; DAROUT, 2014).

Lourenço et al. (2014), utilizando o método de Microarray na análise microbiológica de biofilme subgengival em pacientes com diferentes quadros clínicos, conseguiram observar grupos microbianos específicos em pacientes com doença periodontal e saudáveis, notando-se a maior prevalência de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* nos pacientes com periodontite. Em nosso estudo, foi observada a presença significativa de *A. actinomycetemcomitans* em todos os grupos clínicos avaliados ($p = 0,01$) quando determinada por PCR convencional (Tabela 3), sugerindo-se que este microrganismo constitui parte da microbiota bucal residente. Em indivíduos sadios essa elevada prevalência aliada a outros fatores conhecidos como, biofilme dental e susceptibilidade do hospedeiro, entre outros, podem colaborar para o surgimento e estabelecimento da doença periodontal.

Estudos têm mostrado a enorme diversidade microbiana em termos qualitativos e quantitativos associados à saúde e às diferentes formas de periodontite; entretanto, se destaca a variabilidade dos resultados obtidos devido às limitações relacionadas às técnicas de coleta das amostras clínicas e de detecção microbiana (ABUSLEME et al., 2013; DARVEAU, 2010).

Na cavidade bucal, especificamente em sítios subgengivais, destacam-se aqueles componentes da microbiota denominados periodontopatógenos, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, entre outros (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005; XIMÉNEZ-FYVIE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 2000). Desses microrganismos *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* têm uma importância reconhecida na patogênese dos processos periodontais, sendo o primeiro, considerado o agente etiológico da periodontite agressiva (NEWMAN et al., 1976), e o segundo, como ponte de ligação entre os colonizadores primários e tardios, como também, pela sua propriedade de coagregação bacteriana (BOLSTAD et al., 1996; JAKUBOVICS; KOLENBRANDER, 2010). Desta forma, *F. nucleatum* é encontrado em elevada proporção no biofilme subgengival, e associado às várias condições clínicas periodontais (LOOZEN et al., 2014).

A identificação microbiana é de extrema importância na determinação da microbiota envolvida em um determinado processo infeccioso. Assim, a

identificação de bactérias periodontais pode colaborar para melhor conhecer os agentes etiológicos como possíveis marcadores biológicos que participam no desenvolvimento e progressão das diferentes formas de periodontites (URBÁN et al., 2010).

As principais vantagens da cultura microbiana estão relacionadas à capacidade de detectar vários microrganismos simultaneamente, e de realizar contagens microbianas absolutas (SANZ et al., 2004). Por outro lado, é importante lembrar que, no Brasil, o diagnóstico microbiológico dos processos infecciosos orais, ainda não se constitui exame de rotina em consultórios e clínicas odontológicas (PFAU; AVILA-CAMPOS, 2005). Neste estudo, a análise microbiológica por cultivo, mostrou uma maior recuperação de *F. nucleatum* em relação a *A. actinomycetemcomitans* nos processos clínicos analisados (Tabela 3).

Estudos realizados no Brasil têm mostrado a baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos com gengivite, periodontite crônica, e sadios, quando o método de cultivo foi empregado (GAETTI-JARDIM et al., 2008; MALHEIROS; AVILA-CAMPOS, 2004). Esses baixos números podem ser justificados devido à dificuldade de adaptação desse microrganismo ao meio de cultura seletivo, e pelas suas exigências nutricionais e atmosféricas, dando a este microrganismo um caráter exigente e de difícil cultivo. *A. actinomycetemcomitans* é caracterizado como um microrganismo capnofílico; entretanto, em isolamento primário se observa sua melhor recuperação em atmosfera de anaerobiose. Todos esses fatores podem de alguma forma influenciar no número de microrganismos isolados.

No entanto, as técnicas de cultura podem apresentar limitações quando aplicadas à microbiota bucal, em virtude da manutenção da viabilidade do microrganismo e das dificuldades apresentadas no processamento e manutenção das amostras (DÉRCOLE et al., 2008). Neste estudo, foi utilizado para isolamento de *A. actinomycetemcomitans* o meio seletivo TSBV (Caldo de Soja Tripticaseína Vancomicina Bacitracina). Interessantemente, notou-se além do isolamento deste microrganismo uma boa recuperação de *F. nucleatum*, optando-se pela escolha deste meio de cultura para seu isolamento, uma vez que no meio seletivo Omata & Disraely foi notada uma baixa recuperação desta bactéria. Assim, no meio

seletivo TSBV as colônias de *A. actinomycetemcomitans* apresentaram características típicas da espécie sendo, fortemente aderidas ao meio de cultura, e apresentando uma estrutura interna estrelada quando observada no microscópio estereoscópio (SLOTS, 1982a; SLOTS, 1982b); enquanto as colônias de *F. nucleatum* foram tênueamente amareladas, com bordas regulares e fáceis de serem removidas da superfície do ágar. Tendo em vista a boa recuperação de *F. nucleatum* pode ser sugerida, também, a utilização do meio seletivo ágar TSBV para o isolamento primário deste microrganismo.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se tornado uma ferramenta rápida e eficaz na detecção e identificação de bactérias da cavidade bucal. Em nosso estudo, como era esperada, a detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* foi maior por PCR, em relação ao método de cultivo, entretanto, deve-se lembrar que, por este método molecular detecta-se a presença do DNA microbiano, independente da viabilidade do microrganismo (ASHIMOTO et al., 1996; AVILA-CAMPOS, 2002; KARCHED et al., 2012).

Em nosso estudo, a detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* nos três grupos de indivíduos analisados, foi similar em termos numéricos; entretanto, foi observada diferença significativa ($p = 0,005$) no grupo de indivíduos saudáveis pelo método de PCR convencional.

Por outro lado, nossos resultados mostram que a detecção conjunta de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* por PCR nos processos de gengivite (32,8%) e periodontite crônica (53,3%), foi maior que em indivíduos saudáveis (17,8%). Esse resultado sugere que, nos processos periodontais, esses microrganismos seriam encontrados em maior proporção, e que em estado sinérgico podem produzir danos aos tecidos periodontais do hospedeiro, como já relatado por outros autores (BOLSTAD et al., 1996; RUPANI et al., 2008).

A literatura descreve que apenas cepas aderentes são capazes de colonizar, persistir no tecido do hospedeiro e causar perda óssea em modelos animais experimentais (DIAZ et al., 2006; WILSON; HENDERSON, 2005), e que outros fatores como a produção de leucotoxina e da toxina de distensão citolética (CDT) podem colaborar na agressão aos tecidos do hospedeiro (RAJA; UMMER; DHIVAKAR, 2014). Provavelmente, isto ocorre nos pacientes com gengivite e periodontite crônica. Em nosso estudo, a produção dessas toxinas não foi

avaliada.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans apresenta até 10 biotipos diferentes, e é sugerido que sua distribuição estaria relacionada à localização geográfica e condição clínica do paciente (AVILA-CAMPOS et al., 1995; SLOTS, 1980). Os resultados obtidos neste estudo indicam maior variabilidade de biotipos deste microrganismo em indivíduos com gengivite podendo-se observar até cinco biotipos diferentes (Tabela 4). À diferença, em pacientes com periodontite crônica, somente foram encontrados três biotipos (II, VI e X), e em indivíduos saudáveis a presença de dois biotipos (II e X). Estes dados mostram a variabilidade e heterogeneidade de *A. actinomycetemcomitans* nos diferentes processos infecciosos em que participa.

Em nosso estudo, se observou a maior prevalência do sorotipo c, nos três grupos de indivíduos analisados (Tabela 4 e 5). Em estudo realizado na Indonésia, em indivíduos com periodontite, também foi observado a predominância do sorotipo c (VAN DER REIJDEN et al., 2008), enquanto Cortelli et al. (2012), observaram maior prevalência deste sorotipo em pacientes saudáveis; o mesmo foi notado em nosso estudo, apresentando a prevalência deste sorotipo em 83% dos indivíduos saudáveis avaliados (Tabela 4). Entretanto, Haraszthy et al. (2000), descreveram a predominância de *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b em pacientes com periodontite agressiva localizada; resultados concordantes com aqueles obtidos por Yang et al. (2005) e Teixeira et al. (2006).

Neste estudo, *A. actinomycetemcomitans* sorotipo e somente foi detectado em pacientes com gengivite (43,5%). É sabido que, este sorotipo é raro e pouco frequente em cepas isoladas de processos periodontais (BRÍGIDO et al., 2014). Entretanto, é possível que a presença desse tipo sorológico possa estar relacionada com o processo de gengivite. Entretanto, é sugerida a avaliação de um maior número de cepas isoladas de diferentes quadros clínicos periodontais. Também, esses resultados de tipagem sorológica foram obtidos utilizando-se a técnica de Multiplex-PCR, a qual mostrou ser de utilidade na sorotipagem deste importante periodontopatógeno (Figura 1).

Em revisão sistemática, Brígido et al. (2014), analisaram 85 artigos relacionados à distribuição dos sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* em

diversas regiões geográficas e abrangendo diversos países. Nesse estudo foi observada uma maior predominância dos sorotipos a, b e c nas diferentes condições clínicas, apresentando a maior prevalência do sorotipo c. Estes resultados mostraram a maior prevalência nos indivíduos com periodontite crônica (80%) e nos sadios (83%) (Tabela 4), sugerem também, a predominância deste sorotipo na população brasileira nos diferentes quadros clínicos avaliados.

Do ponto de vista biológico, o biofilme dental proporciona um excelente ambiente para a troca de material genético entre os membros do ecossistema bucal (NOVAK et al., 2001). É possível que, microrganismos incluindo *A. actinomycetemcomitans* possam adquirir elementos genéticos por meio de transformação ou conjugação (WANG et al., 2002). Além disso, mutações pontuais podem ocorrer provocando mudanças aparentemente mínimas e estas podem ocasionar diferenças significativas que resultam em alterações na antigenicidade e na seleção de biotipos nesses microrganismos (FINE et al., 2006).

Os múltiplos biotipos e sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* observados nos três grupos clínicos sugerem a heterogeneidade desse microrganismo que pode estar relacionada com o desenvolvimento e estabelecimento desses processos infecciosos. Certamente, estes dados podem representar parâmetros microbiológicos que podem auxiliar o clínico para um melhor direcionamento do tratamento da doença periodontal.

Neste estudo, não foram detectados os biotipos III, VI, VII, VIII, e IX nem os sorotipos d e f. Isto seria explicado, por serem considerados pouco frequentes ou porque sua presença ou ausência estaria relacionada à característica da população estudada, como já foi mencionado por outros pesquisadores (ABERG et al., 2014; BANDHAYA et al., 2012; CORTELLI et al., 2012).

As técnicas de biotipagem e sorotipagem contribuem para a realização de estudos epidemiológicos, bem como para pesquisas realizadas com indivíduos da mesma família, podendo desta forma, identificar microrganismos com biotipos e sorotipos semelhantes, reforçando a origem familiar da periodontite em suas diferentes formas (GENCO; LOOS, 1991).

A técnica de PCR em tempo real usada para quantificar *A.*

actinomycescomitans e *F. nucleatum*, permitiu a detecção qualitativa e a quantificação de ácidos nucleicos bacterianos nas amostras de biofilmes subgengivais analisadas, proporcionando um diagnóstico preciso destas bactérias. Além disso, a determinação da carga bacteriana pode ser também influenciada pela variação do número de cópias do gene 16S rRNA alvo presente em cada uma das espécies analisadas (NONNENMACHER et al., 2004). Desta forma, a quantificação de importantes periodontopatógenos que estão presentes no ecossistema bucal constitui uma importante ferramenta para o estudo epidemiológico da doença periodontal, podendo contribuir para o diagnóstico precoce da periodontite (LEE et al., 2012).

Neste estudo foi realizada a detecção de *A. actinomycescomitans* e *F. nucleatum* pelos métodos moleculares de PCR convencional e PCR em tempo real; sendo observada uma maior frequência de ambos os microrganismos pelo método quantitativo. Como esperado, por este método foi observada uma maior detecção dos microrganismos analisados em nosso estudo, obtendo-se um maior número de amostras positivas para estas bactérias, como observado na Tabela 6. Os resultados obtidos com este método quantitativo mostrou valores estatisticamente significativos para *A. actinomycescomitans* ($p < 0,02$), e *F. nucleatum* ($p < 0,001$) em relação as amostras de gengivite e saudáveis, sugerindo-se a prevalência desses microrganismos nesse quadro periodontal.

Meng et al. (2009), analisando a microbiota bucal de indivíduos chineses com periodontite crônica e sadios observaram a prevalência de *A. actinomycescomitans* de 33,6% e 0,90%, respectivamente. Recentemente, Wang et al. (2014), verificaram pelo método de PCR quantitativo a prevalência de *A. actinomycescomitans* em diferentes condições clínicas, sendo encontrado em 92,4% dos pacientes com periodontite crônica. Em nosso estudo, valores significativos deste microrganismo também foram observados nos pacientes com gengivite e periodontite crônica ($p < 0,05$), podendo sugerir a associação da presença significativa deste microrganismo ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal.

Apesar de esta bactéria estar associada à periodontite agressiva e ser detectada com frequência em pacientes com periodontite crônica (FINE et al., 2006), diferenças significativas podem ser observadas em sua prevalência. Estas

diferenças são observadas quando diferentes métodos e alguns fatores tais como, variações de temperatura, quantidade da amostra clínica, origem das amostras, integridade do DNA, diferenças geográficas e das populações avaliadas, são aplicados.

Em relação aos valores quantitativos foram observadas pequenas discrepâncias entre os valores mínimos e máximos nos grupos de pacientes avaliados (Tabela 6), sendo notória a diminuição numérica de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* nos indivíduos sadios. Kuboniwa et al. (2004) e Boutaga et al. (2006), também observaram significância estatística de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos com periodontite crônica quando comparados aos pacientes saudáveis. Situação semelhante foi observada com *Fusobacterium nucleatum*, que apresentou maior prevalência nos pacientes com gengivite e periodontite crônica. Sabe-se que, este microrganismo é detectado em grande quantidade no biofilme subgengival de indivíduos com doença periodontal e sadios. Também, apresenta a capacidade de invadir, sobreviver e multiplicar-se em células epiteliais, e estimula a produção de uma variedade de citocinas e moléculas inflamatórias (DABIJA-WOLTER et al., 2011).

Estudos por métodos moleculares têm demonstrado elevada prevalência deste microrganismo em pacientes com periodontite crônica na Holanda (95,7%) (VAN WINKELHOFF et al., 2002), o mesmo foi observado no Chile, Colômbia e Espanha com prevalência de 63,9%, 82,9%, e 100%, respectivamente (HERRERA et al., 2008).

Outros estudos têm mostrado que a distribuição ecológica deste microrganismo pode ser atribuída às diferenças nutricionais dos sítios onde pode ser encontrado, tais como a presença de aminoácidos e peptídeos (DALE et al., 2001), os quais constituem os primeiros substratos relevantes para seu crescimento (OGAWA et al., 2006), produzindo uma mistura de ácido acético e butírico (GHARBIA et al., 1989), necessários para seu metabolismo. Vários fatores de virulência contribuem para a colonização de *F. nucleatum* como a presença de adesinas e proteínas presentes na superfície bacteriana, tal como a adesina Fada de 13-kDa e que está envolvida na ligação às células epiteliais (HAN et al., 2005; LIU et al., 2014).

Fusobacterium nucleatum apresenta várias estratégias para expressar sua

virulência, incluindo a capacidade de induzir a secreção de importantes citocinas, como IL-8 (FENG, WEINBERG, 2006; HAN et al., 2000), produzir collagenase (UITTO et al., 2005), além de promover ações sinérgicas com outros microrganismos nas diversas infecções em que participa (BOLSTAD et al., 1996; HE et al., 2011).

A avaliação quantitativa de *F. nucleatum* mostrou diferenças significativas em indivíduos com gengivite e periodontite crônica, comparados aos indivíduos saudáveis ($p = 0,001$). Em nosso estudo, a elevada prevalência de *F. nucleatum* foi observada no grupo de pacientes com periodontite crônica (90,6%), no entanto, no grupo de indivíduos com gengivite foi notada a frequência de 74,2%, e nos saudáveis de 51,5%. Considerando a presença deste microrganismo no sulco subgengival, como membro da microbiota residente, e sabendo-se de seu importante papel na co-agregação bacteriana dos colonizadores iniciais e finais no biofilme dental, pode ser justificada sua prevalência nos pacientes analisados (Tabela 6).

Os métodos moleculares de PCR convencional e PCR em tempo real foram realizados utilizando-se iniciadores específicos, sendo possível detectar a presença de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* nas amostras analisadas, devido à sensibilidade e precisão das técnicas, que contribuem de maneira efetiva para o monitoramento da doença periodontal, como também, para estudos epidemiológicos das diferentes formas de periodontite.

A aplicação da técnica de AP-PCR utilizando-se oligonucleotídeos de sequências aleatórias tem sido muito utilizada pela facilidade de obtenção de diferentes perfis polimórficos mostrando a diversidade genética de microrganismos alvos auxiliando na comparação clonal (WILLIAMS et al., 1990).

Numa agrupação geral dos *A. actinomycetemcomitans* avaliados, observa-se a formação de 41 grupos genéticos, sendo que 12 grupos abrigaram bactérias com 100% de similaridade (Figura 3, marcados em vermelho). Também, é notado que oito desses grupos abrigaram cepas derivadas de pacientes com o mesmo quadro clínico, isto é, gengivite ou periodontite crônica, e quatro grupos abrigando cepas derivadas de pacientes com diferentes quadros clínicos, ou seja, gengivite e saudável, ou gengivite e periodontite crônica, ou periodontite e saudável. Este resultado mostra a heterogeneidade dessas bactérias periodontais, tornando

difícil uma análise genotípica mais precisa. Quando se avaliaram as cepas isoladas de pacientes com gengivite, observam-se somente três grupos genéticos constituídos cada um deles por duas bactérias com 100% de similaridade (Figura 4), entretanto, somente as bactérias do grupo XIII-B apresentaram o biotipo I e o sorotipo c. Este resultado ressalta a observação anterior quanto à diversidade genética das cepas de *A. actinomycetemcomitans* avaliadas neste estudo.

Na avaliação das cepas isoladas de pacientes de periodontite crônica, seis grupos genéticos, contendo de 3 a 5 bactérias com 100% de similaridade foram observados (Tabela 5); da mesma forma, observa-se uma heterogeneidade quanto aos biotipos e sorotipos bacterianos, notando-se uma predominância do sorotipo c; estes resultados sugerem que a presença destes diferentes clones não seria determinada pelo biotipo, sorotipo, sexo do paciente, quadro clínico e/ou profundidade de sondagem, reforçando mais uma vez a heterogeneidade bacteriana.

Das 12 bactérias isoladas de pacientes sadios, observam-se 11 grupos genéticos, onde dois deles contem cada um, duas cepas com 100% de similaridade (Figura 6); nesse caso, coincidentemente, cada um desses grupos (IV e XI-B), apresentou cepas com o mesmo biotipo e sorotipo derivados de pacientes do mesmo sexo e com igual profundidade clínica de sondagem. Apesar de serem observados 11 grupos genéticos nota-se uma menor variabilidade entre as cepas isoladas destes pacientes.

Estudos têm analisado cepas de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de pacientes de diferentes países, observando também, essa elevada heterogeneidade desta bactéria quanto à biotipagem e sorotipagem (DOGAN et al., 2003; PINHEIRO et al., 2011). De modo geral, com os resultados obtidos pode ser sugerido que na população avaliada não existe predomínio de algum tipo ou cepa de *A. actinomycetemcomitans* com características relevantes para a clínica médica e odontológica. Também, é importante salientar que, a análise de outros fatores, principalmente, da virulência de *A. actinomycetemcomitans* seja necessária para traçar um melhor perfil microbiológico dos diferentes quadros clínicos em que esta bactéria participa, e que certamente, poderá fornecer dados microbiológicos mais específicos visando uma aplicação terapêutica no tratamento dos processos periodontais.

Fusobacterium nucleatum outra bactéria periodontal de enorme importância nos diversos quadros clínicos da cavidade bucal, particularmente da doença periodontal. Também, essa bactéria foi avaliada, observando-se uma elevada diversidade genética entre as cepas isoladas dos três quadros clínicos analisados.

Dos 51 *F. nucleatum* de pacientes com gengivite foram formados IX grupos genéticos sendo que deles foram formados três grupos abrigando cada um deles duas cepas com 100% de similaridade; sendo notado que o sexo, e a profundidade de sondagem (5 a 6 mm) não interferiram na diversidade genética desses microrganismos. Da mesma forma, dos 40 *F. nucleatum* isolados de indivíduos sadios formaram-se XVI grupos genéticos sendo que três deles abrigando cada um, duas cepas com 100% de similaridade, e o sexo dos pacientes não interferiu nestes agrupamentos. Esses resultados mostram além da elevada heterogeneidade bacteriana nos diferentes quadros clínicos periodontais, a necessidade de se avaliar outros fatores, seja fenotípica e/ou genotípicos para poder caracterizar melhor esse grupo microbiano.

Estudos realizados em outros países também têm mostrado a elevada diversidade de *F. nucleatum* obtidos de diferentes quadros clínicos, avaliando-se também, a susceptibilidade às drogas antimicrobianas e a produção de β -lactamases (NWAOKORIE et al., 2012). Da mesma forma, outros autores têm relatado a heterogeneidade desse microrganismo quanto à formação de biofilme, adesão e invasão às células epiteliais (AVILA-CAMPOS et al., 2006; FINE et al., 2006; HARALDSSON et al., 2004; MORAES et al., 2003; NWAOKORIE et al., 2012).

Todos os resultados obtidos neste estudo, e por outros pesquisadores, mostram a heterogeneidade tanto de *A. actinomycetemcomitans* como de *F. nucleatum*, dois periodontopatógenos extremamente importantes nos quadros infecciosos periodontais, evidenciando a dificuldade da determinação de um perfil específico característico para cada uma dessas bactérias, e que a utilização de técnicas com maior sensibilidade como, clonagem, sequenciamento e Multilocus Sequence Typing (MLST), sejam necessários para definir com maior clareza a presença de possíveis tipos específicos dessa população bacteriana que habitam os ecossistemas da cavidade bucal. Por outro lado, é importante lembrar que,

ambos os microrganismos pertencem a microbiota residente bucal humana, e que cumprem funções importantes na regulação da microbiota, e na colonização de sítios específicos, assim como, na iniciação e progressão de processos infecciosos orais e extra-orais.

7 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. A quantificação de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* nos pacientes com gengivite e periodontite foi significativa comparada aos indivíduos sadios;
2. A prevalência de *A. actinomycetemcomitans* biotipo II/sorotipo c foi observada nos três quadros clínicos avaliados;
3. A análise da diversidade genética de *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* mostrou a heterogeneidade de ambos os microrganismos isolados dos três quadros clínicos avaliados.

REFERÊNCIAS*

- ABERG, C. H.; HAUBEK, D.; KWAMIN, F.; JOHANSSON, A.; CLAEISSON, R. Leukotoxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and periodontal attachment loss. **Plos One.**, v. 9, p. 1-11, 2014.
- ABUSLEME, L.; DUPUY, A. K.; DUTZAN, N.; SILVA, N.; BURLESON, J. A.; STRAUSBAUGH, L. D.; GAMONAL, J.; DIAZ, P. I. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. **ISME J.**, v.7, p. 1016-1025, 2013.
- ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann. Periodontol.**, v. 4, n.1, p. 1-6, 1999.
- ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 34, p. 9-21, 2004.
- ARMITAGE, G. C.; ROBERTSON, P. B. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases scientific advances in the United States. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 140, p. 36-43, 2009. Suplemento 1.
- ASIKAINEN, S.; CHEN, C.; SLOTS, J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 11, n. 6, p. 387-394, 1996.
- ASIKAINEN, S.; LAI, C. H.; ALALUUSUA, S.; SLOTS, J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 6, p. 115-118, 1991.
- AVILA-CAMPOS, M. J.; COSTA, J. E. Aspectos ecológicos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: aislamiento y caracterización de cepas. **Rev. Latin. Amer. Microbiol.**, v. 30, p. 301-305, 1988.
- AVILA-CAMPOS, M. J.; CARVALHO, M. A. R.; ZELANTE, F. Distribution of biotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 10, p. 382-384, 1995.
- AVILA-CAMPOS, M. J.; SACCHI, C. T.; WHITNEY, A. M.; STEIGERWALT, A. G.; MAYER, L. W. Arbitrarily Primed-Polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. **J. Periodontol.**, v. 70, p. 1202-1208, 1999.
- AVILA-CAMPOS, M. J. PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples. **Braz. J. Microbiol.**, v. 33, p. 1-4, 2002.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AVILA-CAMPOS, M. J.; RIVERA, I. N.; NAKANO, V. Genetic diversity of oral *Fusobacterium nucleatum* isolated from patients with different clinical conditions. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 48, n. 2, p. 59-63, 2006.

AVILA, M.; OJCIUS, D. M.; YILMAZ, O. The oral microbiota: living with a permanent guest. **DNA. Cell. Biology.**, v. 28, n. 8, p. 405-411, 2009.

ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 11, p. 266-273, 1996.

BARTOLD, P. M.; GULLY, N. J.; ZILM, P. S.; ROGERS, A. H. Identification of components in *Fusobacterium nucleatum* chemostat-culture supernatants that are potent inhibitors of human gingival fibroblast proliferation. **J. Periodntol. Res.**, v. 26, p. 314-322, 1991.

BANDHAYA, P.; SARAITHONG, P.; LIKITTANASOMBAT, K.; HENGPRASITH, B.; TORRUNGRUANG, K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes, the JP2 clone and cytolethal distending toxin genes in a Thai population. **J. Clin. Periodontol.**, v. 39, p. 519-525, 2012.

BELIBASAKIS, G. N.; MATTSSON, A.; WANG, Y.; CHEN, C.; JOHANSSON, A. Cell cycle arrest of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin. **APMIS**, v. 112, p. 674-685, 2004.

BELIBASAKIS, G. N.; JOHANSSON, A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* targets NLRP3 and NLRP6 inflammasome expression in human mononuclear leukocytes. **Cytokine**, v. 59, p. 124-130, 2012.

BENNETT, K. W.; DUERDEN, B. I. E. Identification of fusobacteria in a routine diagnostic laboratory. **J. Appl. Bacteriol.**, v.59, p. 171-181, 1985.

BENÍTEZ-PÁEZ, A.; BELDA-FERRE, P.; SIMÓN-SORO, A.; MIRA, A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. **BMC Genomics.**, v.15, p. 1-13, 2014.

BOLSTAD, A. I.; JENSEN, H. B.; BAKKEN, V. Taxonomy biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 55-71, 1996.

BOSSHARDT, D. D.; STADLINGER, B.; TERHEYDEN, H. Cell-to-cell communication - periodontal regeneration. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 26, p. 229-239, 2015.

BOUTAGA, K.; van WINKELHOFF, A. J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; SAVELKOUL, P. H. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, p. 427-433, 2006.

BRANKATSCHKL, R.; BODENHAUSEN, N.; ZEYER, J.; BÜRGMANN, H. Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 4481-4489, 2012.

BRÍGIDO, J. A.; SILVEIRA, V. R. S.; REGO, R. O.; NOGUEIRA, N. A. P. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals a review of the literature. **Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.**, v. 19, n. 2, p.184-191, 2014.

BROGAN, J. M.; LALLY, E. T.; POULSEN, K.; KILLIAN, M.; DEMUTH, D. R. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 501-508, 1994.

CHEN, C.; J. SLOTS, J. Clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* by the arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Oral. Microbial. Immunol.**, v. 9, p. 99-103, 1994.

CLAESSON, R.; EDLUND, M. B.; PERSSON, S.; CARLSSON, J. Production of volatile sulfur compounds by various *Fusobacterium* species. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 5, p.137-142, 1990.

CLAESSON, R.; LAGERVALL, M.; GLUND-ALBERG, C. H.; JOHANSSON, A. HAUBEK, D Detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in members of a Caucasian family living in Sweden. **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, 115-121, 2011.

COPE, L. D.; LUMBLEY, S. R.; LATIMER, J. L.; KLESNEY-TAIT, J.; RADOLF, J. D.; HANSEN, E. J. A diffusible cytotoxin of *Haemophilus ducreyi*. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 94, p. 4056-4061, 1997.

CORTELLI, J. R.; AQUINO, D. R.; CORTELLI, S. C.; ROMAN-TORRES, C. V. G.; FRANCO, G. C. N.; GOMEZ, R. S.; BATISTA, L. H. B.; COSTA, F. O. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 31, p. 1311-1318, 2012.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E.; COWAN, S. T.; HOLT, J. G.; LISTON, J.; MURRAY, R. G. E.; NIVEN, C. F.; RAVIN, A. W.; STANIER, R. Y. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8 ed. Baltimore: The Williams & Wilkings, 1974. 1268 p.

DABIJA-WOLTER, G.; SAPKOTA, D.; CIMPAN, M.; NEPPELBERG, E.; BAKKEN, V.; COSTEA, D, E. Limited in-depth invasion of *Fusobacterium nucleatum* into in vitro reconstructed human gingival. **Arch. Oral. Biol.**, v. 57, n. 4, p. 344-351, 2011.

DALE, B. A.; KIMBALL, J. R.; KRISANAPRAKORNIT, S.; ROBERTS, F.; ROBINOVITCH, M. O.; O'NEAL, R.; VALORE, E. V.; GANZ, T.; ANSDERSON, G. M.; WEINBERG, A. Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. **J. Periodontol. Res.**, v. 36, p. 285-294, 2001.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 481-490, 2010.

DAROUT, I. A. Oral bacterial interactions in periodontal health and disease. **J. Dent. Oral. Hyg.**, v. 6, n. 5, p. 51-57, 2014.

D'ERCOLE, S.; CATAMOL, G.; TRIPODI, D.; PICCOLOMINI, R. Comparison of culture methods and multiplex PCR for the detection of periodontopathogenic bacteria in biofilm associated with severe forms of periodontitis. **New Microbiol.**, v. 31, p. 383-391, 2008.

DOGAN, B.; ANTINHEIMO, J.; CETINER, D.; BODUR, A.; EMINGIL, G.; BUDUNELI, E.; UYGUR, C.; FIRATI, E.; LAKIO, L.; ASIKAINEN, S. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 74, n.6, p. 803-814, 2003.

DIAZ, R.; GHOFAILY, L.; PATEL, J.; BALASHOVA, N. V.; FREITAS, A. C.; LABIB, I.; KACHLANY, S. C. Characterization of leukotoxin from a clinical strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Microb. Pathog.**, v. 40, p. 48-55, 2006.

DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; OLSEN, I.; FRASER, G. J. Phylogeny of 54 representative strains of species in the family Pasteurellaceae as determined by comparison of 16S rRNA sequences. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 2002-2013, 1992.

DI RIENZO, J. M.; SONG, M.; WAN, L. S.; ELLEN, R. P. Kinetics of KB and HEp-2 cell responses to an invasive, cytolethal distending toxin producing strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 17, p. 245-251, 2002.

DI RIENZO, J. M. Breaking the gingival epithelial barrier: role of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin in oral infectious disease. **Cells**, v. 3, p. 476-499, 2014.

FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontol 2000**, v. 40, p. 50-76, 2006.

FINE, D. H.; KAPLAN, J. B.; KACHLANY, S. C.; SCHREINER, H. C. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. **Periodontol 2000**, v. 42, p. 114-157, 2006.

FIVES-TAYLOR, P. M.; MEYER, D. H.; MINTZ, K. P.; BRISSTE, C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Periodontol 2000**, v. 20, p. 136-167, 1999.

GAETTI-JARDIM, E. J.; WAHASUGUI, T. C.; TOMAZINHO, P. H.; MARQUES, M. M.; NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M. J. Distribution of biotypes and leukotoxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from brazilian patients with chronic periodontitis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, p. 658-663, 2008.

GHARBIA, S. E.; SHAH, H. N.; WELCH, S. G. The influence of peptide on the uptake of amino acids in *Fusobacterium*; predicted interactions with *Porphyromonas gingivalis*. **Curr. Microbiol.**, v. 19, p. 231-235, 1989.

GENCO, R. J.; LOOS, B. G. The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria in periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 18, p. 396-405, 1991.

GENCO, R. J. Host response in periodontal diseases: current concepts. **J.**

Periodontol., v.63, p. 338-355, 1992.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; DIBART, S. Relation of baseline microbial parameters to future periodontal attachment loss. **J. Clin. Periodontol.**, v. 18, p. 744-750, 1991.

HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; TANNER, A.; POLLACK, R. P.; SMITH, C.; KENT, R. L. JR.; SOCRANSKY, S. S. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 5, p. 346-353, 1998.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 30-44, 2015.

HAMADA, S.; KOGA, T.; NISHIHARA, T.; FUJIWARA, T.; OKAHASHI, N. Characterization and immunobiologic activities of lipopolysaccharides from periodontal bacteria. **Adv. Dent. Res.**, v. 2, p. 284-291, 1988.

HAN, Y. W.; SHI, W.; HUANG, G. T.; KINDER HAAKE, S.; PARK, N. H.; KURAMITSU, H.; GENCO, R. J. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3140-3146, 2000.

HAN, Y. W.; IKEGAMI, A.; RAJANNA, C.; KAWSAR, H. I.; ZHOU, Y.; LI, M.; SOJAR, H. T.; GENCO, R. J.; KURAMITSU, H. K.; DENG, C. X. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 5330-5340, 2005.

HARALDSSON, G.; HOLBROOK, W. P. ; KÖNÖNEN E. Clonal persistence of oral *Fusobacterium nucleatum* in infancy. **J. Dent. Res.**, v. 83, p. 500-504, 2004.

HARALDSSON, G. ; HOLBROOK, W. P., KÖNÖNEN, E. Clonal similarity of salivary and nasopharyngeal *Fusobacterium nucleatum* in infants with acute otitis media experience. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 161-165, 2004.

HARASZTHY, V. I.; HARIHARAN, G.; TINOCO, E. M. B.; CORTELLI, J. R.; LALLY, E. T.; DAVIS, E.; ZAMBON, J. J. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomyetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 912-922, 2000.

HAUBEK, D.; POULSEN, K.; WESTERGAARD, J.; DAHLEN, G.; KILIAN, M. Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomyetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p. 1576-1578, 1996.

HERRERA, D.; CONTRERAS, A.; GAMONAL, J.; OTEO, A.; JARAMILLO, A.; SILVA, N.; SANZ, M.; BOTERO, J. E.; LEON, R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p.106-113, 2008.

HE, X.; HU, W.; KAPLAN, C. W.; GUO, L.; SHI, W.; LUX, R. Adherence to streptococci facilitates *Fusobacterium nucleatum* integration into an oral microbial community. **Microb. Ecol.**, v. 63, p. 532-542, 2011.

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R. L. Bacterial interaction is dental biofilm. **Virulence**, v. 2, p. 435-444, 2011.

ISRAEL, J. Neue beobachtungen auf dem gebiete der mykosen des menschen. **Arch. Pathol. Anat.**, v. 74, p. 15-20, 1878.

JAKUBOVICS, N. S.; KOLENBRANDER, P. E. The road to ruin: the formation of disease associated oral biofilms. **Oral Dis.**, v. 16, 729-739, 2010.

JIN, L. J.; ARMITAGE, G. C.; KLINGE, B. ; LANG, N. P.; TONETTI, M.; WILLIAMS, R. C. Global oral health inequalities: Task Group-Periodontal Disease. **Adv. Dent. Res.**, v. 23, n. 2, p. 221-226, 2011.

KAPLAN, J. B.; PERRY, M. B; MACLEAN, L. L.; FURGANG, D.; WILSON, M. E.; FINE, D. H. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5375-5384, 2001.

KAPLAN, J. B.; SCHREINER, H. C.; FURGANG, D.; FINE, D. H. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain isolated from localized juvenile periodontitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, n. 40, p.1181-1187, 2002.

KARCHED, M.; FURGANG, D.; SAWALHA, N.; FINE, D. H. Rapid identification of oral isolates of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* obtained from humans and primates by an ultrafast super convection based polymerase chain reaction. **J. Microbiol. Methods.**, v. 89, n. 1, p. 71-75, 2012.

KATZ, J.; BLACK, K. P.; MICHALEK, S. M. Host responses to recombinant hemagglutinin B of *Porphyromonas gingivalis* in an experimental rat model. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4352-4359, 1999.

KAWAMOTO, D.; ANDO, E. S.; LONGO, P. L.; NUNES, A. C. R.; WIKSTRÖM, MAYER, M. P. A. Genetic diversity and toxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 24, p. 493-501, 2009.

KILIAN, M.; FRANDSEN, E. V. G.; HAUBEK, D.; POULSEN, K. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. **Periodontol 2000**, v. 42, p. 158-179, 2006.

KLINGER, R. Untersuchungen über menschliche Aktinomykose. **Zentralbl Bakteriol.**, v. 62, p. 191-200, 1912.

KIM, A. S.; FRANK, P.; EICKHOLZ, P.; EICK, S.; KIM, C. K. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. **J. Periodontol.**, v. 80, p. 2020-2027, 2009.

KOLEMBRANDER, P. E.; PALMER, R. J.; PERIASAMY, S.; JAKUBOVICS, N. S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 471-480, 2010.

KOOK, J. K.; PARK, S. N.; LIM, Y. K.; CHOI, M. H.; CHO, E.; KONG, S. W.; SHIN,

Y.; PAEK, J.; CHANG, Y. H. *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* Gharbia and Shah 1992 is a Later Synonym of *Fusobacterium nucleatum* subsp. *Vincentii* Dzink et al. 1990. **Curr. Microbiol.**, v. 66, p. 414-417, 2013.

KUBONIWA, M.; AMANO, A.; KIMURA, R. K.; SEKINE, S.; KATO, S.; YAMAMOTO Y.; OKAHASHI, N.; IIDA, T.; SHIZUKUIISHI, S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 168-176, 2004.

LALLY, E. T.; KIEBA, I. R.; GOLUB, E. E.; LEAR, J. D.; TANAKA J. C. Structure function aspects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. **J. Periodontol.**, v. 67, p. 298-308, 1996.

LEE, H. J.; KIM, J. K.; CHO, J. Y.; LEE, J. M.; HONG, S. H. Quantification of subgingival bacterial pathogens at different stages of periodontal diseases. **Curr. Microbiol.**, v. 65, p. 22-27, 2012.

LI, L.; MATEVSKI, D.; ASPIRAS, M.; ELLEN, R. P.; LEPINE, G. Two epithelial cell invasion related loci of the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 16-25, 2004.

LIU, P., YI LIU, Y.; WANG, J.; GUO, Y.; ZHANG, Y.; SHUIQING XIAO, S. Detection of *Fusobacterium nucleatum* and fada adhesin gene in patients with orthodontic gingivitis and non-orthodontic periodontal inflammation. **Plos One.**, v. 9, e85280, 2014.

LOESCHE, W. J. Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. **Appl. Microbiol.**, v. 18, p. 723-727, 1969.

LOOZEN, G.; OZCELIK, O.; BOON, N.; DE MOL, A.; SCHOEN, C.; QUIRYNEN, M.; TEUGHEL, W. Interbacterial correlations in subgingival biofilms: a large-scale survey. **J. Clin. Periodontol.**, v. 41, p. 1-10, 2014.

LOURENÇO, T. G. B.; HELLER, D.; SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; COTTON, S. L.; PASTERAND, B. J.; COLOMBO, A. P. V. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. **J. Clin. Periodontol.**, v. 41, p. 1027-1036, 2014.

MALHEIROS, V. J.; AVILA-CAMPOS, M. J. Detection of pathogens from periodontal lesions. **Rev. Saúde Públ.**, v. 38, p. 723-728, 2004.

MAYER, M.; BUENO, L.; HANSEN, E.; DIRIENZO, J. M. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, v.67, p. 1227-1237, 1999.

MENG, S.; ZHAO, L.; YANG, H.; WU Y.; OUYANG, Y. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in chinese chronic periodontitis patients and periodontally healthy adults. **Quintessence Int.**, v. 40, p. 53-60, 2009.

MEYER, D. H.; FIVES-TAYLOR, P. M. The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease. **Trends Microbiol.**, v. 5, p. 224-228, 1997.

MEYER, A. S.; GARCIA, A. A. G.; SOUZA, A. P.; SOUZA, C. L. JR. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L). **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, n.1, p. 83-91, 2004.

MÖLLER, A. J. R. Microbiological examination of root and periapical tissues of human teeth. **Odontol. Tidskr.**, v. 74, p. 1-380, 1966.

MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol** 2000, v. 5, p. 66-77, 1994.

MORAES, S. R.; SIQUEIRA, J. F. JR.; ROCAS, I. N.; FERREIRA, M. C. S.; DOMINGUES, R. M. C. P. Clonality of *Fusobacterium nucleatum* in root canal infections. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 17, p. 394-396, 2003.

MORRIS, M. L.; ANDREWS, R. H.; ROGERS, A.H. The use of allozyme electrophoresis to assess genetic heterogeneity among previously subspeciated isolates of *Fusobacterium nucleatum*. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 11, p. 15-21, 1996.

NEWMAN, M. G.; SOCRANSKY, S. S.; SAVITT, E. D.; PROPAS, D. A.; CRAWFORD, A. Studies of the microbiology of periodontosis. **J. Periodontol.**, v. 47, n. 7, p. 373-379, 1976.

NONNENMACHER, C.; DALPKE, A.; MUTTERS, R.; HEEG, K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. **J. Microbiol. Methods.**, v. 59, p. 117-125, 2004.

NORSKOV-LAURITSEN, N.; KILIAN, M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* segnis as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor dependent and V factor independent isolates. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 2135-2146, 2006.

NWAOKORIE, F. O.; COKER, A. O.; OGUNSOLA, F. T.; AYANBADEJO, P. O.; UMEIZUDIKE, K. A.; GAETTI-JARDIM, E. J.; AVILA-CAMPOS, M. J.; SAVAGE, K. O. AP-PCR and antimicrobial susceptibility patterns of *Fusobacterium nucleatum* associated with chronic periodontitis among patients at Lagos university teaching hospital. **Br. Microbiol. Res. J.**, v. 2, n. 2, p. 97-107, 2012.

NOVAK, K. F.; DOUGHERTY, B.; PELAEZ, M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* harbours type IV secretion system genes on a plasmid and in the chromosome. **Microbiology**, v. 147, p. 3027-3035, 2001.

PAJUKANTA, R.; ASIKAINEN, S.; SAARELA, M.; ALALUUSUA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. In vitro antimicrobial susceptibility of different serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 101, p. 299-303, 1993.

PARK, S. N.; CHO, E.; KIM, H. S.; KIM, D. S.; JUNG, J.; BAEK, J. H.; LIM, Y. K.; JO, E.; CHANG, Y. H.; SHIN, J. H. Draft genome sequence of *Fusobacterium nucleatum*

subsp. *animalis* ChDC F324, isolated from a human subgingival plaque in the Republic of Korea. **Genome Announc.**, v. 1, p.13, 2013.

PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E. Molecular microbial diagnosis. **Periodontol** 2000, v. 51, p. 38-44, 2009.

PERIASAMY, S.; CHALMERS, N. I.; DU-THUMM, L.; KOLENBRANDER, P. E. *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes *Streptococcus oralis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 3250-3257, 2009.

PFAU, E. A.; AVILA-CAMPOS, M. J. *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* isolated from osseointegrated dental implants: colonization and antimicrobial susceptibility. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 281-285, 2005.

PICKETT, C. L.; COTTLE, D. L.; PESCI, E. C.; BIKAH, G. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1046-1051, 1994.

PINHEIRO, E.T.; KAWAMOTO, D.; OTA-TSUZUKI C.; ALMEIDA, L. R.; NUNES, A. C.; LONGO, P.L.; WIKSTROM, M.; MAYER, M. P. Analysis of genotypic variation in genes associated with virulence in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clinical isolates. **J. Periodontal. Res.**, v. 46, n.3, p. 310-317, 2011.

PREUS, H. R.; ZAMBON, J. J.; DUNFORD, R. G.; GENCO, R. J. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 65, p. 2-7, 1994.

OGAWA, A. T.; SOUZA, T. A. C. B.; UZEDA, M.; JANKEVICIUS, J. V.; JANKEVICIUS, S. I. Characterization of proteolytic activities of *Fusobacterium nucleatum*. **J. Endod.**, v. 32, p. 521-523, 2006.

OKUDA, J.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y. Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. **Microb. Pathol.**, v.18, p.167-172, 1995.

OKUDA, T.; KOKUBU, E.; KAWANA, T.; SAITO, A.; OKUDA, K.; ISHIHARA, K. Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella species*. **Anaerobe**, v. 18, p. 110-116, 2012.

RAJA, M.; UMMER, F.; DHIVAKAR, C. P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - A Tooth Killer? **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 8, n.8, p. 13-16, 2014.

ROBRISH, S. A.; OLIVER, C.; THOMPSON, J. Amino acid-dependent transport of sugars by *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 3891-3897, 1987.

ROMAN-TORRES, C. V. G.; AQUINO, D. R.; CORTELLI, S. C.; FRANCO, G. C. N.; SANTOS, J. G.; CORRINI, P.; HOLZHAUSEN, M.; DINIZ, M. G.; GOMEZ, R. S.; CORTELLI, J. R. Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of

Aggregatibacter actinomycetemcomitans in chronic periodontitis brazilian subjects. **Arch. Oral. Biol.**, v. 55, p. 242-248, 2010.

RILEY, M.; KILIAN, M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p. 346-361, 2008.

RUPANI, D.; IZANO, E. A.; SCHREINER, H. C.; FINE, D. H.; KAPLAN, J. B. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype f O-polysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 127-130, 2008.

SANZ, M.; LAU, L.; HERRERA, D.; MORILLO, J. M.; SILVA, A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, p. 1034-1047, 2004.

SANZ, M.; D' AIUTO, F.; DEANFIELD, J.; FERNANDEZ-AVILE, F. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease - scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. **Euro. Heart. J.**, v. 12, p. B3- B12, 2010. Suplemento 12.

SCOTT, D. A.; KAPER, J. B. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 244-251, 1994.

SETTEM, R. P.; EL-HASSAN, A. T.; HONMA, K.; STARFFORD, G. P.; SHARMA, A. *Fusobacterium nucleatum* and *Tannerella forsythia* induce synergistic alveolar bone loss in a mouse periodontitis model. **Infect. Immun.**, v. 80, p. 2436-2443, 2012.

SCHENKEIN, H. A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 40, p. 77-93, 2006.

SHENKER, B. J.; MCKAY, T.; DATAR, S.; MILLER, M.; CHOWHAM, R.; DEMUTH, D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* immunosuppressive protein is a member of the family of cytolethal distending toxins capable of causing a G2 arrest in human T cells. **J. Immunol.**, v. 162, p. 4773-4780, 1999.

SHENKER, B. J.; BESACK, D.; MCKAY, T. L.; PANKOSKI, L.; ZEKAVAT, A. ; DEMUTH, D. R. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin (Cdt): evidence that the holotoxin is composed of three subunits: CdtA, CdtB, and CdtC. **J. Immunol.**, v. 172, p. 410-417, 2004.

SIGNAT, B.; ROQUES, C.; POULET, P.; DUFFAUT, D. Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 13, p. 25-36, 2011.

SOCRANSKY, S. S; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000**, v. 38, p. 135-187, 2005.

STARKE, E. M.; SMOOT, J. C.; SMOOT, L. M.; LIU, W. T.; CHANDLER, D. P.; LEE, H. H.; STAHL, D. A. Technology development to explore the relationship between oral health and the oral microbial community. **BMC Oral. Health.**, v. 15, p. 1-8, 2006.

SLOTS, J. The predominant cultivable organism in juvenile periodontitis. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 84, p. 1-10, 1976.

SLOTS, J. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 85, p. 247-254, 1977.

SLOTS, J.; REYNOLD, H. S.; GENCO, R. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross sectional microbiological investigation. **Infect. Immun.**, v. 29, p. 1013-1020, 1980.

SLOTS, J. Salient biochemical characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Arch. Microbiol.**, v. 131, p. 60-67, 1982a.

SLOTS, J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 15, p. 606-609, 1982b.

SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. **Periodontol 2000**, v. 20, p. 7-13, 1999.

SLOTS J. Herpesviral-bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 20, n. 3, p. 278-283, 2007.

TAKADA, K., SAITO, M., TSUZUKIBASHI, O.; KAWASHIMA, Y.; ISHIDA, S.; HIRASAWA, M. Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Mol. Oral. Microbiol.**, v. 25, p. 200-206, 2010.

TAN, K. S.; SONG, K. P.; ONG, G. Cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Occurrence and association with periodontal disease. **J. Periodontal. Res.**, v. 37, p. 268-272, 2002.

TANNER, A.; MAIDEN, M. F.; MACUCH, P. J.; MURRAY, L. L.; KENT, R. L. JR. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 2, p. 85-98, 1998.

TELES, R. P.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. Microbiological goals of periodontal therapy. **Periodontol 2000**, v. 42, p. 180-218, 2006.

TEIXEIRA, R. E.; MENDES, E. N.; CARVALHO, M. A. R.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. M.; MAGALHÃES, P. P. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, p. 182-188, 2006.

TOPLEY, W. W. W.; WILSON, G. S. **The Principles of Bacteriology and Immunity**. 1 ed. London: Edward Arnold, 1929. 587 p.

URBÁN, E.; TERTHES, G.; RADNAI, M.; GORZÓ, I.; NAGY, E. Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. **Anaerobe**, v. 16, p. 283-288, 2010.

UITTO, V. J.; BAILLIE, D.; WU, Q.; GENDRON, R.; GRENIER, D.; PUTNINS, E. E.; KANERVO, A.; FIRTH, J. D. *Fusobacterium nucleatum* increases collagenase 3

production and migration of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1171-1179, 2005.

VAN DER REIJDEN, W. A.; BOSCH-TIJHOF, C. J.; VAN DER VELDEN, U.; VAN WINKELHOFF, A. J. Java project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p. 487-492, 2008.

VAN WINKELHOFF, A. J.; LOOS, B. G.; VAN DER REIJDEN, W. A.; VAN DER VELDEN, U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, p. 1023-1028, 2002.

WANG, Y.; GOODMAN, S. D.; REDFIELD, R. J.; CHEN, C. Natural transformation and DNA uptake signal sequences in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 3442-3449, 2002.

WANG, X.; LI, L.; YANG, M.; GENG, Y.; CHEN, H.; XU, Y.; SUN, Y. Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *ts cdtB* gene in subgingival plaque of Chinese periodontitis patients. **BMC. Oral. Health.**, v. 14, p. 2-7, 2014.

WARINNER, C.; RODRIGUES, J. F. M.; VYAS, R.; TRACHSEL, C.; SHVED, N.; GROSSMANN, J.; RADINI, A.; HANCOCK, Y.; TITO, R. Y.; FIDDYMENT, S.; SPELLER, C.; HENDY, J.; CHARLTON, S.; LUDER, H. U.; SALAZAR-GARCIA, D. C.; EPPLER, E.; SEILER, R.; HANSEN, L. R.; CASTRUITA, J. A. S.; BARKOW-OESTERREICHER, S.; TEOH, K. Y.; KELSTRUP, C. D.; OLSEN, J. V.; NANNI, P.; KAWAI, T.; WILLERSLEV, E.; von MERING, C.; LEWIS, C. M.; COLLINS, M. J.; GILBERT, M. T.; RÜHLI, F.; CAPPELINI, E. Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity. **Nat. Genet.**, v. 46, p. 336-344, 2014.

WILSON, M.; HENDERSON, B. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. **FEMS Rev. Microbiol.**, v. 17, p. 365-379, 1995.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKY, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

XIMÉNEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Comparison of the microbiota of supra-and subgingival plaque in health and periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 27, p. 648-657, 2000.

YANG, H. W.; HUANG, Y. F.; CHAN, Y. F.; CHOU, M. Y. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 113, p. 28-33, 2005.

YOUNG, V. B.; KNOX, K. A.; SCHAUER, D. B. Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 184-191, 2000.

ZAMBON, J. J.; SLOTS, J.; GENCO, R.J. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. **Infect. Immun.**, v.41, p. 19-27, 1983.

ZAMBON, J. J.; CHRISTERSSON, L. A.; SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. **J. Periodontol.**, v. 54, p. 707-711, 1983.

ZAMBON, J. J.; UMEMOTO, T.; NARDIN, E.; F. NAKAZAWA, J.; CHRISTERSSON, A.; GENCO, R. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of human periodontal disease. **Adv. Dent. Res.**, v. 2, p. 269-274, 1988.