



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



Concordância do Orientador

Declaro que a aluna Mabelle de Freitas Monteiro sob o RA 092142 esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Avaliação da transmissibilidade de patógenos periodontais em familiares de indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada.” no ano de 2012.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 08 de Outubro de 2012.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'M' and 'Z' followed by 'Casati'.

Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



**Avaliação da transmissibilidade de patógenos
periodontais em familiares de indivíduos portadores
de periodontite agressiva generalizada.**

Mabelle de Freitas Monteiro

Ano de 2012

Piracicaba, SP

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



MABELLE DE FREITAS MONTEIRO

**Avaliação da transmissibilidade de patógenos
periodontais em familiares de indivíduos portadores
de periodontite agressiva generalizada.**

Orientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin

Ano de 2012

Piracicaba, SP

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

M764a

Monteiro, Mabelle de Freitas, 1990-
Avaliação da transmissibilidade de patógenos
periodontais em familiares de indivíduos portadores de
periodontite agressiva generalizada / Mabelle de Freitas
Monteiro. – Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Márcio Zaffalon Casati.
Coorientador: Renato Corrêa Viana Casarin.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontite Agressiva. 2. Família. 3. Actinobacillus
actinomycetemcomitans. 4. Saliva. I. Casati, Márcio Zaffalon,
1973-II. Casarin, Renato Corrêa Viana. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. IV. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à minha mãe, Zulmira, pessoa a qual admiro imensamente e que sempre foi minha inspiração e maior exemplo, me fazendo inclusive escolher esta profissão maravilhosa que é a odontologia.

Dedico também, ao professor Renato Corrêa Viana Casarin, idealizador deste projeto, meu orientador de iniciação científica e com quem aprendi muito durante este período de graduação.

A vocês serei eternamente grata.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as belas oportunidades que me concedeu, tanto profissionais quanto pessoais, e que me fizeram crescer e ser quem eu sou hoje. Obrigada pela fé inabalável que me impulsionou sempre para vencer meus desafios e realizar meus sonhos.

Agradeço também a meus familiares, minha mãe Zulmira, meu pai Adenir, Felipe, Vera e minha irmã Mayara. Você são pessoas super especiais na minha vida e sem o apoio de vocês jamais conseguiria ficar em Piracicaba este tempo. Superei a enorme saudade, os momentos de desânimo e de dificuldades, e tive vocês como exemplo. Podem ter certeza que vocês são grandes responsáveis pelas minha realizações, conquistas e pelas coisas que acredito. Amo vocês!

Agradeço a Larissa Resende, Beatriz Porto, Marcela Ribeiro, Nádia Olsen, Francine Trainotti e Vanessa Salomão, mulheres com quem tive o prazer de morar e crescer. Foram quatro anos juntas, algumas discussões, desentendimentos, mas nada que chegasse perto do quão grande foram nossas alegrias, risadas, histórias pra contar e amadurecimento que atingimos juntas. Definitivamente... sentirei muitas saudades de vocês.

Agradeço a meus queridos amigos Carolina Ventura, Núbia Pini, Thatiana Leite, Izabella Pereira, Caroline Odo, Diogo Henrique, João Otávio, Aziz Neto, Arthur Lerbach, Rodrigo Paixão, Nayara Virginia pelo tempo que passamos juntos e pelas alegrias que me proporcionaram. Vocês foram pra mim uma fonte de força inesgotável, pessoas com quem pude contar a todo momento, que me consolaram, aliviaram um pouco o peso das saudades que sempre senti e me fizeram ter muitas boas histórias pra contar aos meus netinhos.

Agradeço aos meus amigos do C.A. XXI de Abril, Bruno Micaroni, Gabriela Porto, Lucas Tomaselli, Diego Tetzner, Maurício Guarda e Rodrigo Freire. Foi muito esforço, confusões e dificuldades que enfrentamos este ano, mas a consciência tranquila de que fizemos o que podíamos e a amizade que conquistei ao

trabalharmos juntos me faz ter certeza de que tudo valeu a pena. Foram três anos muito felizes e que vocês fizeram se encerrar com chave de ouro. Tenho certeza que as reuniões até tarde, as aulas que fomos obrigados a não assistir, o “tempo perdido” em vários momentos já foram recompensados com muito crescimento, maturidade e com amigos que lembrarei eternamente. Vocês são de fato uma de minhas famílias.

Agradeço a Turma-53, por todos os bons momentos que vivemos juntos, compartilhando risadas e choros, brincadeiras e raivas, festas e trabalhos. Só nós sabemos o que vivemos e quantas saudades sentiremos. Adorei crescer com vocês.

Gostaria de agradecer ao professor Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati a orientação, a confiança depositada e a nova oportunidade de trabalho que me ofereceu.

Agradeço também aos Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin, idealizador do projeto que deu origem a este trabalho e orientador da minha iniciação científica. Sou eternamente grata pela confiança, pelo apoio, pela orientação e por tudo que me ensinou neste período. Não tenho dúvida do quanto você é importante na minha vida acadêmica e sei que boa parte do que conquistei até aqui devo a sua ajuda.

Agradeço aos demais mestres todos o ensino oferecido nestes quatro anos, que me fizeram crescer e amar a odontologia. Se em breve serei uma cirurgiã dentista é graças a vocês.

Agradeço a FAPESP pelo apoio e pelo financiamento que durou de março de 2011 a agosto de 2012 e que possibilitou a realização deste projeto.

Enfim, obrigada a todos que estiveram comigo, que fizeram meus dias muito mais felizes e que incondicionalmente me apoiaram, muitas vezes acreditando mais no meu potencial que eu mesma.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

*“Trabalha como se tudo dependesse de ti,
e confia como se tudo dependesse de Deus.”*

Santo Inácio de Loyola

RESUMO

Estudos demonstram que a Periodontite Agressiva está relacionado a diferentes fatores que podem contribuir ou explicar sua instalação e progressão. Pode-se citar um padrão microbiano relativamente constante nesses indivíduos, um resposta inflamatória alterada e também um claro fator genético associado. Sendo assim, indivíduos portadores de periodontite agressiva podem transmitir para seus descendentes alterações genéticas que favoreceriam a ocorrência desse tipo de doença periodontal, da mesma forma que transmitir patógenos de maneira vertical, desde o nascimento de seus filhos. Dessa forma, o estudo avaliou a transmissibilidade de patógenos periodontais em famílias nas quais os pais apresentam histórico de periodontite agressiva generalizada (PAG), comparando-as com a característica bacteriana oral de famílias com saúde periodontal.

Foram selecionadas 30 famílias para participação no estudo as quais foram divididas em 2 grupos: Grupo Teste (n=15): famílias as quais os pais (ou pelo menos um dos cônjuges), apresentam periodontite agressiva generalizada e possuem pelo menos 1 filho com idade entre 6 e 12 anos; Grupo Controle (n=15): famílias as quais os pais (necessariamente ambos) apresentam saúde periodontal e possuem um filho com idade entre 6 e 12 anos. Para a composição dos grupos foi realizada uma análise gender- e aged-matched, a fim de obter grupos similares quanto a esses fatores. Todos os indivíduos envolvidos no estudo foram avaliados clinicamente quanto a condição periodontal (índice de placa e sangramento gengival, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e posição da margem gengival). De cada indivíduo participante do estudo (pais, mães e filhos) foi realizada uma coleta do biofilme subgengival dos 4 sítios periodontais com maior profundidade de sondagem. Foi também coletada amostra de saliva estimulada. Das amostras de biofilme subgengival e saliva, foi extraído o DNA bacteriano e avaliado, por meio de PCR Real time, as quantidades totais de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*. Os dados clínicos e microbiológicos foram comparados entre os grupos segundo a classe qual pertencem (pais ou filhos), por meio do teste T de Student. Foi realizada uma análise da transmissão vertical dos patógenos de pais para filhos em ambos os grupos, determinando, por meio de Odds ratio, a risco de infecção de cada patógeno.

Pela avaliação estatística constatou-se que as crianças de famílias com PAG apresentaram maior frequência de detecção de Aa (90%) na saliva que crianças de famílias saudáveis (45%). Pais com agressiva apresentaram uma concentração de Pg na saliva estatisticamente maior que pais saudáveis, situação não constatada na comparação das crianças. Na análise de transmissão vertical e do risco de infecção das crianças por meio do Odds Ratio constatou-se que crianças que apresentam pelo menos um dos pais positivos para Aa na saliva apresentam 16,3 mais risco de ser infectado pelo Aa. Para a avaliação subgengival constatou-se, de forma semelhante à saliva, que as crianças de famílias com PAG apresentaram maior frequência de detecção de Aa (63%) que crianças de famílias saudáveis (28,6%). A concentração de Aa no meio subgengival de crianças com PAG e de Pg em pais com PAG foi estatisticamente maiores que as encontradas no grupo controle. Na análise do risco relativo não foi detectado risco significativo da contaminação paterna em relação à contaminação das crianças para o ambiente subgengival.

Pode-se concluir que as crianças oriundas de famílias com periodontite agressiva generalizada possuem uma maior colonização por *A. actinomycetemcomitans*, sendo que a detecção deste na cavidade oral dos pais representa um risco 16 vezes maior para a colonização.

Palavras-chaves: Periodontite agressiva, Família, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Saliva

ABSTRACT

Aggressive periodontitis is frequently associated to several factors that try to explain its initiation and progression. A constant microbial colonization, an altered inflammatory host response and a clear genetic factor are cited as possible factors associated to this pathology. Thus, aggressive periodontitis subjects could transmit genetic polymorphisms as well as microbial associated to periodontal destruction to their descendents, increasing the risk of develops this disease. This way, this project is aimed in evaluate the transmission of periodontal pathogens within families of generalized aggressive periodontitis compared to families of oral health subjects.

Thirty families will be selected and divided in two groups: Test group (n=15 families) families in which the parents (or at least one of them) present generalized aggressive periodontitis and a son aged to 6 to 12 years old; Control group (n=15 families) families in which the parents (both of them) present periodontal healthy and a son aged to 6 to 12 years old. The groups will be composed using a gender- and age-matched structure, in order to assure the similarity of these features. All individuals (parents and children) will be clinically assessed (plaque and bleeding indices, periodontal probing depth, clinical attachment level and gingival recession), and from each subject will be collected subgingival biofilm from periodontal pockets/sites and stimulated saliva. From subgingival biofilm and saliva, total DNA will be extracted and, using a real time PCR reaction, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* levels will be determined. Clinical and microbiological data from each group will be compared by Student's t test. Vertical transmission in each group also will be determined and the Odds ratio of infection's risk to each pathogen assessed.

The statistical analysis indicate that children from families with GAP showed higher frequency of detection of Aa (90%) than children of healthy families (45%). Parents with GAP showed a Pg concentration in saliva statistically higher than healthy parents, however, this difference was not found in the children comparison. In the infection risk calcutaion (Odds Ratio) indicate that children who have at least one parent positive for Aa have 16.3 more risk of be infected with Aa. No signiticative transmission risk was found for other pathogens.

The statistical analysis for subgingival biofilm indicated, as occurred with saliva test, that children from families with GAP showed higher frequency of detection of Aa (63%) than children of healthy families (28,6%). In the subgingival environment, the concentration of Aa in GAP children and of Pg of GAP parents was statically greater than demonstrated in control group. In the Odds Ratio test no substantial risk was detected for contamination of the children if parents was infected by subgingival microorganisms.

In conclusion, GAP children have a higher colonization from Aa and the detection of this bacteria in the parents oral cavity represent a risk of 16 times higher for colonization.

Key words: Aggressive periodontitis, Family, Actinobacillus actinomycetemcomitans, saliva

SUMÁRIO

Introdução e revisão de literatura	13
Proposição	15
Material e métodos	16
Resultados	21
Discussão	28
Conclusão	36
Referências Bibliográficas	37
Comitê de Ética	43

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Periodontite agressiva é definida pela Academia Americana de Periodontia (AAP) como uma patologia periodontal que promove a destruição rápida e severa dos tecidos de suporte periodontais em indivíduos jovens, sistemicamente saudáveis (Armitage, 1999). Essa condição apresenta baixa prevalência mundial, estando presente em aproximadamente 0,5% da população jovem em países desenvolvidos (Albandar & Tinoco, 2002), embora em países em desenvolvimento, como o Brasil, essa patologia pode ser verificada em até 5% da população (Susin et al, 2005).

Mesmo sendo relativamente rara, a periodontite agressiva tem sido amplamente estudada em diversos países, na busca de determinar características que levem a instalação e progressão dessa doença. Entre esses estudos, dois aspectos tem mostrado uma íntima relação com a doença: característica hereditária (alterações genéticas) e microbiota específica.

Segundo a própria classificação da AAP, periodontite agressiva apresenta maior prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e, em certas populações, *Porphyromonas gingivalis*. Além disso, uma característica hereditária também consta nas definições da AAP para a periodontite agressiva (Tonetti & Mombelli, 1999).

Diversos grupos avaliaram a relação da microbiota com a presença da doença periodontal agressiva. Embora Mombelli et al (2000) em uma revisão de literatura tenha mostrado não ser possível determinar uma microbiota única para esses indivíduos, inúmeros outros estudos mais recentes, utilizando-se de técnicas mais sensíveis, mostraram haver uma íntima relação de certos patógenos como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* (Pg) com a periodontite agressiva (Gajardo et al, 2005, Cortelli et al, 2005). Recentemente, em uma população brasileira, Casarin et al (2010) mostrou que em indivíduos com periodontite agressiva, maiores quantidades de Aa podem ser encontradas em bolsas periodontais, comparado a indivíduos com periodontite crônica. Dessa forma, fica claro que a presença desses patógenos pode ser importante na instalação e progressão da periodontite, visto que esses apresentam inúmeros fatores de virulência (Takeuchi et al, 2006, Tanaka et al, 2006) e tem sido descritos como patógenos periodontais verdadeiros (Socransky & Haffajee, 2005), associados a

presença de bolsas profundas e maiores índices de destruição periodontal (Kononen et al, 2007).

Nesse contexto, o entendimento maior da origem e do período de infecção por esses patógenos pode auxiliar no controle e também no maior entendimento do papel destes na patogênese da doença, podendo no futuro ser utilizado como um preditor da instalação e progressão da destruição dos tecidos periodontais (Grossi et al, 1994, Grossi et al, 1995).

Sabe-se inicialmente que indivíduos oriundos de famílias com histórico de periodontite agressiva podem apresentar alterações genéticas que favoreçam a ocorrência desta, ao tempo que sabe-se também que a família é a grande responsável pela transmissão vertical entre os indivíduos, em especial pela saliva (Umeda et al, 2004, Tamura et al, 2006), durante a primeira infância. Entretanto, essa relação ainda é empírica quando considera-se a ocorrência da periodontite agressiva.

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo avaliar a transmissibilidade de patógenos periodontais em famílias nas quais os pais apresentam histórico de periodontite agressiva generalizada, comparando-as com a característica bacteriana oral de famílias com saúde periodontal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho do estudo

Foi delineado um estudo de caso-controle, comparando a transmissão vertical entre parentes da mesma família em duas populações distintas, com periodontite agressiva e com saúde periodontal.

Seleção das famílias

Foram selecionadas famílias que foram divididas segundo os critérios de inclusão de cada grupo:

- Grupo teste (n=15): famílias com pais (ou pelo menos um dos cônjuges) portadores de periodontite agressiva generalizada, e pelo menos 1 filho com idade entre 6 e 12 anos;

- Para o diagnóstico de *periodontite agressiva generalizada* foram considerados os seguintes critérios:

- 1) idade inferior a 35 anos no momento do diagnóstico;
- 2) presença de pelo menos 8 dentes com profundidade de sondagem e perda de inserção ≥ 5 mm (sendo pelo menos 2 sítios com profundidade de sondagem > 7 mm);
- 3) pelo menos 20 dentes restantes na cavidade oral;
- 4) apresentar boa saúde sistêmica;

- Grupo Controle (n=15): famílias com pais (necessariamente ambos) apresentando saúde periodontal e possuam um filho com idade entre 6 e 12 anos.

- Para o diagnóstico de *saúde periodontal* foram considerados os seguintes critérios de inclusão:

- 1) ausência de bolsa periodontais/sulcos gengivais com profundidade de sondagem > 4 mm;
- 2) pelo menos 20 dentes na cavidade oral;

Foram considerados critérios de exclusão as seguintes condições:

- Hábito tabagista atual ou no passado;
- Gravidez ou lactantes;
- Uso de medicação antibiótica ou anti-inflamatória nos período prévio de 6 meses ao estudo;
- Tratamento periodontal prévio no período de 6 meses antes da coleta das amostras;

Para a realização do estudo foi realizado um ajuste para a idade e sexo dos filhos de cada família. Assim, após a seleção das famílias do grupo teste, no qual os pais apresentam periodontite agressiva, foi realizada a seleção de famílias do grupo controle, as quais os filhos apresentam uma distribuição equilibrada para idade e gênero.

Parâmetros clínicos

Os parâmetros clínicos avaliados foram:

1. Índice de Placa – **IP** (Ainamo & Bay, 1975);
2. Sangramento à sondagem - **SS** (Mühlemann & Son, 1971);
3. Recessão Gengival – **RG** distância da margem gengival à junção cimento esmalte.
4. Nível Clínico de Inserção – **NIC**: distância da junção cimento esmalte até a base, clinicamente detectável, da bolsa periodontal.
5. Profundidade de Sondagem – **PS** (NICR - PMG): distância da margem gengival à base, clinicamente detectável, da bolsa periodontal.

Todos os parâmetros clínicos foram obtidos utilizando uma sonda periodontal do tipo Carolina do Norte, por um examinador calibrado e experiente (RCVC).

Análise Microbiológica

Coleta da amostras

De cada indivíduo participante do estudo (pais, mães e filhos) foi realizada coleta do biofilme subgengival e saliva estimulada para a análise microbiológica.

Para a coleta do biofilme subgengival foram selecionados os primeiros molares superiores e inferiores de cada indivíduo. Caso o mesmo não apresente nenhum desses elementos, foi feita a coleta na região adjacente mais próxima (distal do segundo pré-molar ou mesial do segundo molar, por exemplo). A coleta do biofilme subgengival foi realizada utilizando-se cones de papel esterilizados, 4 em cada elemento (mesial, vestibular, distal e palatina/lingual). A área, para coleta do material, foi devidamente isolada e seca com rolos de algodão esterilizados. Após 30 segundos os cones de papel foram removidos e colocados em tubos para microcentrifugação (eppendorf) com solução Tris-EDTA, codificados para cada um dos pacientes. Os eppendorfs foram mantidos em temperatura de -20° C até a realização do ensaio.

Após a coleta do biofilme subgengival, foi coletada amostra da saliva para a avaliação dos microrganismos presentes na cavidade oral das mesmas. Para isso, foi dado aos participantes parafilme o qual deverá ser mastigado por 2,5 minutos. A saliva acumulada nos primeiros 30 segundos foi descartada e a saliva colhida nos 2 minutos seguintes coletada em tubo de ensaio estéril. Após o bochecho, os tubos foram guardados em freezer a -4 graus para posterior avaliação laboratorial. Esse protocolo segue o padrão estabelecido por Boutaga et al (2007).

Extração do DNA

Os eppendorfs foram vortexados e os cones de papel removidos com auxílio de pinça clínica. Para as amostras de saliva esse passo não foi realizado. Todas as amostras foram então centrifugadas para remoção do sobrenadante (solução transporte). Foram adicionados 700 μ L de tampão de extração, foi feita nova

vortexação e então foram deixadas em banho-maria por 30 minutos à 65°C (a cada 10 minutos homogeneizar 20 vezes suavemente).

As etapas seguinte foram: adicionar 650 µL de CIA, homogeneizar até formar uma emulsão (20 vezes) e centrifugar à 12.000-15.000 rpm, durante 7 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubo novo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 200 µL de tampão de extração sem proteinase K. Foi feita então homogeneização para adição de 650 µL de CIA. Seguiu-se nova homogeneização e centrifugação à 12.000-15.000 rpm, durante 7 minutos.

A fase aquosa foi transferida para outro tubo novo, ao qual foi adicionado 650 µL de CIA, seguindo-se a centrifugação à 12.000-15.000 rpm, durante 7 minutos. O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol à temperatura ambiente e então foi feita homogeneização (20 vezes) e centrifugação à 12.000-15.000 rpm, durante 7 minutos. A superfície do precipitado foi lavada 1 vez com 50 µL de etanol 70% preparado pouco tempo antes do uso e então centrifugado por 2 minutos. O precipitado foi seco, deixando o tubo aberto sobre bancada, ao lado de bico de Busen. Após, foi feita ressuspensão em 40 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) + 10 µg/mL de RNase e para deixar em banho-maria à 37°C por 30 minutos.

Cinco µL da amostra foram utilizados para checar a qualidade e estimar a quantidade do DNA, num gel de agarose 0.8-1.0%. Correu junto um padrão de massa conhecida (pGEM).

PCR real time

As amostras de biofilme subgengival e de saliva estimulada, foram analisadas quanto as concentrações de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Para isso, foram realizados os seguintes passos:

DESENHO DOS PRIMERS: Os “primers” específicos para *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, foram utilizados. Todos os “primers” foram verificados quanto a sua especificidade através

da verificação da curva de Melting (obtida depois de corrida no LightCycler) e correndo gel para verificação dos produtos.

OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES: A utilização do SYBR Green I exige a obtenção de produtos específicos de PCR, em função disso a eficácia das reações para “primer” foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando de 2 a 5 mM de MgCl₂ e de 0,2 a 0,5 μM de cada “primer” foram utilizados para se determinar em quais condições a reação teria a melhor eficiência. Condições essas sugeridas pelo fabricante do equipamento.

REAÇÕES DE REAL-TIME PCR (RT-PCR): As reações de RT-PCR foram realizadas com o sistema LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando-se o kit “ FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics Co.)”. O perfil das reações foi determinado seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. Para cada uma das “corridas”, a água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando-se o programa do próprio fabricante (LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH).

Análise estatística

A comparação da frequência e quantidade dos patógenos periodontais avaliados foram realizadas pelos teste Qui-quadrado e T de Student. A relação entre a presença do patógeno entre os pais e a presença do mesmo nos descendentes, foi determinado por análise de frequência multivariada, determinando-se qual dos indivíduos é o que apresenta maior importância na prevalência do patógenos. Em todos as análises, foi considerado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

O total de indivíduos incluídos neste estudo foi de 96, sendo 48 pais e 48 filhos divididos igualmente entre os grupos de famílias controle e PAG (com doença periodontal agressiva). A fim de facilitar o entendimento e a discussão dos dados obtidos, os resultados foram separados em análise demográfica e clínica, análise salivar e análise dos dados obtidos dos sítios periodontais.

Aspectos demográficos e clínicos

Na Tabela 1 pode-se observar a distribuição dos pais de ambas as famílias quanto ao gênero, idade e também condições clínicas. Em vista do estudo ter assumido uma metodologia controlada para idade e gênero, confirma-se a ausência de diferença significativa entre os grupos quanto à esses parâmetros ($p>0.05$). Além disso, deve-se notar que os grupos foram semelhantes para o nível educacional dos pais e também de renda mensal ($p>0.05$).

Como esperado, os pais das famílias com histórico de periodontite agressiva generalizada apresentaram piores condições clínicas, apresentando um maior índice de placa, sangramento e também de profundidade de sondagem ($p<0.05$).

Tabela 1. Características de pais e filhos com saúde e histórico de PAG em relação a condições demográficas e clínicas.

	<i>Pais com Saúde</i> (n=26)	<i>Pais com PAG</i> (n=26)	<i>p</i>
<i>Idade (anos±sd)</i>	35.5±2.4	38.1±3.3	0.1*
<i>Nível educacional</i>	<i>Básico</i>	30%	35%
	<i>Secundário</i>	52%	59%
	<i>Alto</i>	18%	6%
<i>Renda mensal (%)</i>	<2488 BRL	29	60
	2488-4976 BRL	64	40
	>4976 BRL	7	0
<i>\$ (mean±SD)</i>	3278.6±2147.7	2070.0±894.5	0.12*
<i>Número de sítios presentes com PS>4mm</i>	0.0±0.0	19.5±6.8	<0.0001*
	<i>Crianças com saúde (n=24)</i>	<i>Crianças com agressiva (n=24)</i>	<i>p</i>
<i>Idade*</i>	8.7±3.2	9.1±4.2	0.7302
<i>Gênero</i>	13 mulheres	13 mulheres	1.0000

*Teste T-Student ($p<0.05$);# Teste Chi-Square ($p<0.05$) □

Na tabela 2 pode-se notar novamente a semelhança entre as crianças das famílias incluídas do presente estudo em relação à idade e gênero ($p>0.05$). Entretanto, interessante, pode-se também notar que os filhos dos indivíduos com GAP apresentaram um maior índice de placa, sangramento e também profundidade de sondagem ($p<0.05$).

Tabela 2. Características de pais e filhos com saúde e histórico de PAG em relação a condições demográficas e clínicas.

	<i>Crianças saúde (n=24)</i>	<i>Crianças PAG (n=24)</i>	<i>p*</i>
<i>Idade</i>	8.7±3.2	9.1±4.2	0.7302
<i>Gênero</i>	13 mulheres	13 mulheres	1.0000
<i>IP(%)</i>	24.1±11.1	43.1±22.2	0.0011
<i>IG (%)</i>	1.7±2.5	12.0±10.1	0.0001
<i>PPD (mm±SD)</i>	1.6±0.3	2.1±0.4	0.0000

*Teste T-Student ($p<0.05$);# Chi-Square test ($p<0.05$)

Análise da microbiota salivar

Na tabela 3 estão descritas as frequências de detecção, ou seja, a porcentagem de infecção pelas bactérias avaliadas no presente estudo na saliva dos indivíduos. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa na frequência salivar de *P. gingivalis* e *T. forsythia* entre os grupos, considerando a comparação pais VS pais e filhos VS filhos ($p>0.05$). No entanto, os resultados do Aa indicam uma diferença na presença salivar das crianças das famílias do grupo teste (GAP), quando comparadas às crianças das famílias saudáveis (90,0% e 45,5%, respectivamente, $p<0.05$). Entretanto, na comparação dos pais de ambos os grupos, não foi detectada diferença ($p>0.05$).

Tabela 3. Detecção de frequência de patógenos periodontais na saliva de famílias com saúde e com PAG.

			%	p^*
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Famílias Saudáveis</i>	<i>Pais</i>	59.1	
		<i>Crianças</i>	45.5	
	<i>Famílias PAG</i>	<i>Pais</i>	81.3	0.17
		<i>Crianças</i>	90.0	0.0006
<i>P. gingivalis</i>	<i>Famílias Saudáveis</i>	<i>Pais</i>	45.5	
		<i>Crianças</i>	22.7	
	<i>Famílias PAG</i>	<i>Pais</i>	80.0	0.1
		<i>Crianças</i>	52.6	0.08
<i>T. forsythia</i>	<i>Famílias Saudáveis</i>	<i>Pais</i>	90.9	
		<i>Crianças</i>	88.5	
	<i>Famílias PAG</i>	<i>Pais</i>	92.9	0.34
		<i>Crianças</i>	95.0	0.42

*Teste de Fisher Exact para comparação entre pais com saúde e PAG e crianças com saúde e PAG. ($\alpha=5\%$). □

Além da análise da frequência, foram quantificadas as concentrações de Aa, *P. gingivalis* e *T. forsythia* na saliva dos indivíduos incluídos na pesquisa. Novamente houve uma diferença estatisticamente significativa na quantidade de Aa salivar na comparação entre as crianças oriundas das famílias saudáveis em comparação às famílias doentes ($p<0.05$), embora não tenha sido observada diferença entre os pais de ambos os grupos ($p>0.05$).

No entanto, na comparação quantitativa de *P. gingivalis* na saliva, houve uma maior concentração de Pg nos pais das famílias com GAP comparada aos pais com saúde periodontal ($p < 0.05$). Entre os filhos, não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$).

Tabela 4. Quantificação dos patógenos na saliva das famílias saudáveis e com histórico de PAG.

		Indivíduos	log []	SD	p*	
A. <i>actinomycetemcomitans</i>	<i>Famílias Saudáveis</i> (n=15)		Pais	1.59	1.52	
			Crianças	0.87	1.32	
	<i>Famílias PAG</i> (n=15)	Pais	2.58	1.89	0.17	
		Crianças	3.01	1.65	<0.001	
	<i>P. gingivalis</i>	<i>Famílias Saudáveis</i> (n=15)		Pais	1.62	1.54
				Crianças	0.78	1.19
<i>Famílias PAG</i> (n=15)		Pais	3.00	1.54	0.04	
		Crianças	0.96	1.06	0.44	
<i>T. forsythia</i>	<i>Famílias Saudáveis</i> (n=15)		Pais	5.47	1.97	
			Crianças	5.51	1.64	
	<i>Famílias PAG</i> (n=15)	Pais	5.93	0.72	0.51	
		Crianças	5.87	0.82	0.40	

† Teste T-student não pareado para comparação entre pais de famílias saudáveis e famílias com PAG e entre crianças de famílias saudáveis e famílias com PAG. ($\alpha = 5\%$).

Também foi calculado o Risco Relativo de uma criança ser positiva para as espécies avaliadas quando pelo menos um dos pais é positivo para a mesma espécie, independentemente da condição periodontal dos pais. Foi encontrado um Odds ratio de 16.3 ($p=0.0007$) para a contaminação da criança por Aa quando os pais são contaminados, indicando um alto risco de transmissão vertical do Aa. Para as outras espécies avaliadas não foram encontradas relações significantes.

Tabela 5. Risco relativo (Odds Ratio) de “criança infectada” se “pai infectado”.

	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	16.3	3.1-87.2	0.0007
<i>P. gingivalis</i>	1.5	0.2-11.2	0.91
<i>T. forsythia</i>	23.0	0.6-702.6	0.34

Análise da microbiota subgengival

Os dados da microbiota subgengival dos indivíduos estão descritos nas tabelas 6 e 7. Os resultados indicam uma semelhança entre a análise salivar e subgengival, uma vez que na saliva foi novamente encontrada diferença na frequência de detecção de Aa para as crianças oriundas das famílias teste em comparação às famílias controle ($p<0.05$), embora não tenha havido diferença entre os pais ($p>0.05$). Além disso, ainda avaliando a frequência de detecção, houve um maior prevalência de Pg no ambiente subgengival dos pais do grupo teste quando comparado aos pais periodontalmente saudáveis. Em relação às outras espécies, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p>0.05$).

Tabela 6. Detecção subgengival de patógenos periodontais em famílias com saúde e com PAG.

			%	p*	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Famílias Saudáveis</i>	<i>Pais</i>	50.0		
		<i>Crianças</i>	28.6		
	<i>Famílias GAP</i>	<i>Pais</i>	68.2	0.34	
		<i>Crianças</i>	63.2	0.05	
	<i>P. gingivalis</i>	<i>Famílias Saudáveis</i>	<i>Pais</i>	30.0	
			<i>Crianças</i>	23.8	
<i>Famílias GAP</i>		<i>Pais</i>	63.6	0.04	
		<i>Crianças</i>	52.6	0.1	
<i>T. forsythia</i>	<i>Famílias Saudáveis</i>	<i>Pais</i>	65.0		
		<i>Crianças</i>	23.8		
	<i>Famílias GAP</i>	<i>Pais</i>	86.4	0.15	
		<i>Crianças</i>	52.6	0.1	

*Teste de Fisher Exact para comparação entre pais com saúde e PAG e crianças com saúde e PAG. ($\alpha=5\%$). □

Na análise quantitativa, os resultados foram os mesmos àqueles encontrados na análise de frequência, indicando maiores concentrações de Aa nas crianças do grupo teste e maiores de Pg nos pais do grupo teste comparados às famílias controle ($p<0.05$). Houve uma tendência a maiores concentrações de Tf nos pais e filhos das famílias teste em comparação às famílias controle, com um valor de $p=0.09$ e 0.07 respectivamente.

Tabela 7. Quantidade de patógenos periodontais subgingivais em famílias com saúde e com PAG.

			<i>log []</i>	<i>SD</i>	<i>p*</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Famílias Saudáveis (n=15)</i>	<i>Pais</i>	1.66	1.86	
		<i>Crianças</i>	0.71	0.93	
	<i>Famílias PAG (n=15)</i>	<i>Pais</i>	2.23	2.08	0.46
		<i>Crianças</i>	1.78	1.49	0.03
<i>P. gingivalis</i>	<i>Famílias Saudáveis (n=15)</i>	<i>Pais</i>	0.86	1.27	
		<i>Crianças</i>	0.63	1.10	
	<i>Famílias PAG (n=15)</i>	<i>Pais</i>	2.82	2.32	0.01
		<i>Crianças</i>	1.58	1.87	0.11
<i>T. forsythia</i>	<i>Famílias Saudáveis (n=15)</i>	<i>Pais</i>	3.5	3.2	
		<i>Crianças</i>	1.80	2.70	
	<i>Famílias PAG (n=15)</i>	<i>Pais</i>	5.40	2.60	0.09
		<i>Crianças</i>	3.50	3.20	0.07

* Teste T-Student não pareado para comparação entre pais com saúde e PAG e crianças com saúde e PAG. ($\alpha=5\%$).

Na análise do risco relativo não foi detectado risco significativo da contaminação paterna em relação à contaminação das crianças para o ambiente subgingival ($p>0.05$), como visto na tabela 8.

Tabela 8. Risco relativo (Odds Ratio) de “criança infectada” se “pai infectado”.

	<i>Odds Ratio</i>	95% intervalo de confiança	<i>p</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	4.7	0.8-27.1	0.18
<i>P. gingivalis</i>	3.4	0.66-17.02	0.27
<i>T. forsythia</i>	0.87	0.2-3.7	0.85

DISCUSSÃO

Mesmo com o foco dado por inúmeros estudos científicos nas últimas décadas, a periodontite agressiva ainda é considerada um desafio quanto ao seu diagnóstico, tratamento e conhecimento de sua etiopatogenia. Embora diferentes técnicas e possibilidades biológicas tenham sido testadas ainda não há características patognomônicas para o diagnóstico da periodontite agressiva generalizada (PAG). A Academia Americana de Periodontia indica que essa doença está associada a uma característica hereditária (embora ainda não se possa afirmar qual modificação genética está relacionada à PAG) e à presença em maior prevalência e concentração de patógenos específicos, entre eles *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e, em certas populações, *Porphyromonas gingivalis* (Armitage 1999). Assim, baseando-se nessas características, o presente estudo avaliou a presença desses patógenos na saliva e no biofilme subgengival em famílias as quais os pais apresentam histórico de PAG e seus filhos, comparando essas frequências e concentrações com famílias apresentando saúde periodontal. Com essa comparação pode-se avaliar se filhos de indivíduos com PAG podem apresentar uma maior prevalência de patógenos periodontais, indicando um maior risco de alterações periodontais futura.

Os resultados indicaram que houve uma maior frequência e quantidade de *A. actinomycetemcomitans* na saliva e no biofilme subgengival das crianças das famílias as quais os pais apresentam histórico de PAG comparado a crianças filhas de pais periodontalmente saudáveis. Além disso, na avaliação de risco, a chance de uma criança apresentar Aa na saliva quando os pais apresentam essa bactéria foi de 16 vezes, valor estatisticamente significativo. O Aa é um microrganismo gram negativo, facultativo que apresenta uma íntima relação com a PAG. Vários estudos mostraram que houve uma maior frequência (Gajardo et al, 2006, Cortelli et al, 2005) e concentração (Casarin et al, 2010) de Aa no ambiente subgengival de indivíduos com PAG quando comparados à indivíduos saudáveis e/ou com periodontite crônica. Entretanto, essa relação não é confirmada em outros estudos (Heller et al, 2012, Rescala, et al 2010, Mombelli et al, 2000). Interessantemente, quando a concentração e frequência de Aa entre os pais participantes do presente estudo foram comparadas, não foi detectada diferença estatisticamente significativa. Isso deve-se

provavelmente ao fato de que os indivíduos com PAG foram previamente tratados e apresentavam-se em manutenção periodontal. Diversos estudos clínico-microbiológicos mostram que o tratamento da PAG, em especial, quando associado à antibioticoterapia sistêmica, promove uma redução significativa nos níveis de Aa (Mestnik et al, 2010, Casarin et al, 2012). Entretanto vale ressaltar que os pais das famílias PAG apresentaram maiores valores de profundidade de sondagem que os indivíduos do grupo controle, indicando a presença de alguns sítios recorrentes/refratários. Além disso, essa indicação de que mesmo após o tratamento e redução dos microrganismos orais dos indivíduos afetados pela doença periodontal os familiares ainda estão sujeitos a contaminação e/ou manutenção de uma microbiota adquirida foi testada por Kleinfelder et al, em 1999. Neste estudo os pesquisadores comprovaram que mesmo com o tratamento do indivíduo com doença periodontal associado à presença de Aa há uma clara persistência deste nos outros membros familiares, comprovando a plausibilidade da semelhança entre os pais embora os filhos das famílias com PAG apresentem maiores níveis de infecção por Aa (Kleinfelder et al, 1999).

Quando os resultados da composição da saliva são considerados em separado, pode-se notar que há uma clara relação da contaminação paterna e infantil. A saliva é a via mais comum de transmissão vertical de microrganismos orais (Asikainen et al, 1997; Rosa et al, 2002). Mesmo em indivíduos periodontalmente saudáveis, a saliva pode ser positiva para *A. actinomycetemcomitans* e pode, portanto, ser uma fonte de transmissão (Asikainen et al., 1991). Estudos mostraram que o *A. actinomycetemcomitans* na saliva pode ser do mesmo tipo clonal como os encontrados na placa subgingival na maioria dos pacientes (Petit et al. 1993a, 1993b, van Steenberghe et al. 1993, von Troil-Linde'n et al. 1996, Asikainen et al. 1997). Além disso, para que haja a contaminação vertical, há a necessidade de que na saliva os microrganismos estejam viáveis e em número suficiente, embora essa concentração mínima para contaminação ainda não tenha sido definida (Van Winkelhof e Boutaga, 2005). A viabilidade do *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* foi confirmada em estudos prévios, os quais mostraram que ambos podem ser cultivados a partir da saliva de pacientes com periodontite (Van Winkelhoff et al. 1988, Asikainen et al., 1991). Sendo assim, a saliva é uma forte candidata como uma via de transmissão de bactérias orais e, em especial, periodontopatógenas.

Soma-se ainda o fato de que não há evidência de que as bactérias periodontais possam ser transmitidas através de aerossóis, confirmando que a saliva e contato direto da mucosa são as vias de transmissão de bactérias periodontais (Van Winkelhof e Boutaga, 2005). Essa transmissão de pais para filho é então definida como Transmissão vertical.

Tem sido demonstrado que o *A. actinomycetemcomitans* tem uma clara agregação familiar (Zambon et al. 1983, Listgarten 1988, Gunsolley et al. 1990, van der Velden et al. 1993, Tuite-McDonnell et al. 1997). Estas observações sugerem que a bactéria pode ser transmitida entre os membros da família e que eles compartilham fatores de susceptibilidade para a colonização por estas bactérias ou tipos clonais dessas espécies. Em um estudo com famílias marroquinas que dividiam fatores de risco para transmissão bacteriana (por exemplo, dividir alimentos e bebidas), ficou clara a forte relação familiar para a presença do Aa (Haubek et al, 2005). Essa afirmação é especialmente importante para explicar a relação familiar da periodontite agressiva, explicitada na classificação das doenças periodontais da Academia Americana de Periodontia (Armitage, 1999) e observada em nossos resultados.

Um importante estudo sobre a distribuição de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* entre os membros da família é de Asikainen et al. (1996). Eles estudaram 47 famílias para a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* e 31 famílias de *P. gingivalis*. Indivíduos “teste” foram selecionados com base na presença de doenças periodontais ou crianças Aa-positivas. Foi indicado que cônjuges de pacientes com periodontite com *A. actinomycetemcomitans* foram sete vezes tão frequentemente infectados com o microrganismo, em comparação com cônjuges de pacientes bactéria-negativo. Os cônjuges de pacientes com cultura positiva para *P. gingivalis* foram duas vezes mais positivo em relação aos cônjuges dos pacientes negativos para esta espécie. Apenas um dos 19 filhos com um indivíduo *P. gingivalis*-positivo apresentou *P. gingivalis* detectável.

Com base nesses resultados, fica clara que a transmissão vertical de *A. actinomycetemcomitans*, mas não de *P. gingivalis* pode ocorrer mais facilmente. A maioria dos estudos têm mostrado que se as crianças são portadoras de Aa, geralmente um ou dois pais são portadores do mesmo genótipo. A partir destas observações, é assumido que a famílias é a fonte de transmissão. Em uma recente

revisão, van Winkelhoff & Boutaga (2005) calcularam que a transmissão de Aa pode ser de 30% a 60% com base na detecção de genótipos idênticos em crianças e pais.

Contudo, dois pontos chamam a atenção nesses resultados. Em primeiro lugar de todas as bactérias testadas no presente estudo apenas o Aa mostrou uma relação de transmissão entre pais e filhos, embora essa não pode ser afirmada uma vez que não fora realizado testes genotípicos para determinação de clones similares entre ambos. Além disso, a transmissão depende de fatores genéticos dos microrganismos, por exemplo, algumas cepas de certas espécies são mais prontamente transmitidas do que outras. Não se sabe qual a dimensão do inóculo existente ou quantos eventos de exposição são necessários para maximizar a possibilidade de sucesso para a transmissão do *A. actinomycetemcomitans* (Asikainen; Chen, 2000). Entretanto, é provável que quanto maior a carga destes na saliva, maior o risco de colonização do hospedeiro. Portanto, supressão dos microrganismos na saliva pode prevenir que estes se espalhem entre indivíduos (Leite et al, 2008).

O Aa tem algumas características que justificam essa maior probabilidade de transmissão de adultos para crianças. Aa é um bacilo gram negativo, anaeróbio facultativo, o que poderia facilitar sua colonização na saliva e também em outros ambientes orais com maior demanda de oxigênio. Na avaliação de estudos avaliando a presença do Aa fica clara a alta variabilidade da prevalência desse patógeno na população. Boutaga et al. (2003) utilizaram um real-time PCR para detectar *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em 111 periodontais indivíduos saudáveis e 259 doentes adultos com periodontite. *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* foram detectados em 18% e 9,9%, respectivamente, em indivíduos sem periodontite. Em contraste, a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em adultos chineses sem periodontite foi de 78%, exemplificando diferenças geográficas na prevalência de *A. actinomycetemcomitans*. Em crianças japonesas sem periodontite (2-12 anos), *A. actinomycetemcomitans* foi encontrado em 4,8% dos indivíduos. No Brasil, a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* apareceu muito maior em indivíduos sem doença periodontal destrutiva (70% e 78%, respectivamente) em comparação com a população holandesa (van Winkelhof e Boutaga, 2005).

Um segundo ponto é a ausência de resultados indicativos de transmissão das outras espécies analisadas. Em um grande estudo sobre a transmissão de *P. gingivalis* dentro das famílias, Tuite-McDonnell et al. (1997) utilizaram a técnica de PCR para detectar *P. gingivalis* em 564 membros de 104 famílias recrutados da igreja e organizações comunitárias, em Columbus, OH, EUA. Cento e uma das famílias continha dois pais, pelo menos uma criança e pelo menos um avô. A criança vivia com os pais no momento da amostragem, os pais tinham vivido juntos por pelo menos 2 anos e os pais tinham vivido com os avós, pelo menos, até a idade de 15 anos. Em relação à transmissão vertical, crianças e seus pais também foram significativamente mais concordantes. A mãe positiva para *P. gingivalis* daria a uma criança um risco para a colonização 4,7 vezes maior do que uma criança com uma mãe não colonizada. Este risco foi de 2,98 para os pais colonizados e uma criança. O risco para a colonização foi maior quando a criança tinha dois pais colonizados por *P. gingivalis*. Com base nessas observações, Tuite-McDonnell et al. concluiu que o contato "com um membro da família infectado aumentou substancialmente o risco relativo de colonização para cônjuges, filhos e seus pais, adultos e sua mãe e irmãos". Entretanto, no presente estudo, e em outros estudos avaliando a transmissão vertical de Pg não mostrou os mesmos resultados.

Tamura et al, 2006, avaliou a presença de 10 patógenos na saliva de mães e filhos. Corroborando com o presente estudo, foi encontrada uma relação positiva entre a presença de Aa nas mães e nos filhos. Entretanto, para *P. gingivalis* e *T. forsythia* não fora detectada relação indicativa de transmissão vertical. Os resultados do presente estudo corroboram com o de Tamura et al para as bactérias testadas. Assim como não houve diferença na concentração e prevalência de Pg, Tf entre as crianças das famílias PAG e crianças das famílias controle, também não houve um risco significativo de contaminação paterna para os filhos. Essa ausência de uma clara transmissão vertical desses patógenos foi também indicada por outros estudos (van Winkelhof e Boutaga, 2005). Uma possibilidade para a ausência, em relação ao Pg, para essa não transmissão vertical poderia ser a íntima relação da presença desse patógeno, e também do Aa, com a idade. A prevalência de *A. actinomycetemcomitans* parece diminuir com a idade, enquanto a prevalência de *P. gingivalis* aumenta com a idade (Rodenburg et al. De 1990, Slots et al. De 1990, Savitt & Kent, 1991). Kononen et al (2007) avaliando fatores que determinam a

presença na saliva de patógenos periodontais, também indicou uma clara relação entre a prevalência de Pg e o aumento da idade, embora para outras bactérias esse resultado não tenha sido encontrado. Assim, nas crianças há uma menor contaminação por Pg, provavelmente por características específicas desses patógenos (anaeróbio estrito, não móvel, gram negativo) que favorecem sua presença na doença periodontal. Essa possibilidade fica clara quando se observa uma diferença na presença e concentração de Pg entre os indivíduos adultos com histórico de periodontite agressiva e com periodonto saudável observado em nossos resultados, seja na análise da saliva como do biofilme subgingival. Em relação ao P. intermedia, o trabalho de Tamura et al, (2006), indicou uma concentração na saliva de crianças e adultos relativamente baixa. Esse fato pode se dever a inclusão de indivíduos previamente doentes no presente estudo, diferentemente do estudo de Tamura et al (2006). A P. intermedia, assim como o P. gingivalis, está relacionado à doença periodontal, e possui características para colonização que são favorecidas na presença doença, justificando os resultados obtidos.

Além da avaliação da microbiota salivar, no presente estudo foi também avaliada a presença e concentração no ambiente subgingival. Os resultados indicaram conclusões semelhantes aos encontrados na avaliação da saliva, ou seja, uma clara relação de transmissão do Aa e ausência para os outros microrganismos. Esses resultados podem indicar a correlação entre a composição microbiana de ambos ambientes, mesmo que com características diferentes. Recentemente, Saygun et al, 2011, correlacionou o número de cópias de cada patógenos (Aa, Pg, Tf, Prevotella intermedia e Campylobacter rectus) na saliva com a condição periodontal dos indivíduos. Em relação ao Pg, Tf e Pi os resultados mostraram um relação positiva entre o número de cópias e a presença de periodontite. Interessantemente, e ressaltando os resultados do presente estudo, o Aa mostrou-se um indicador da periodontite agressiva quando comparado a indivíduos saudáveis.

Dogan et al, 2008 avaliou a presença do Aa, e sua divisão em diferentes sorotipos, em famílias com proband-Aa positivos. Os resultados deste estudo seguem os resultados obtidos em nossa análise. Houve uma relação entre a colonização do proband e seus filhos, independentemente do sorotipo encontrado, com uma taxa de transmissão de 73%. Além desse resultado microbiológico, foi

ressaltado que os indivíduos jovens das famílias apresentaram uma alta taxa de periodontite agressiva (Dogan et al, 2008). Segundo os autores, isso pode representar, e na verdade, confirmar, o maior risco existente da presença de alterações gengivais nos familiares de indivíduos com PAG (Dogan et al, 2008). Embora nenhuma criança do presente estudo tenha sido diagnosticada com perda de inserção, na comparação entre os grupos ficou evidente a pior condição gengival desses indivíduos, com maiores índices de sangramento, placa e profundidade de sondagem. Esse resultado, também de grande relevância, deve ser avaliado com atenção uma vez que podem estar envolvidos não somente fatores de risco individuais para a doença como também um perfil de famílias com menor atenção à higiene oral. Embora avaliando famílias e, segundo a Academia Americana de Periodontia indique essa relação familiar da PAG, ainda não há resultados totalmente conclusivos para essa relação. Recentemente, nosso grupo não identificou uma relação familiar na distribuição de polimorfismos da IL-8 em famílias de portadores de PAG (Andia et al, 2012). Assim, mais estudo e uma avaliação de diversos fatores confundidores para a higiene oral devem ser avaliados em estudos futuros.

Entretanto, embora os resultados obtidos sejam em sua maioria comprovados pela literatura científica, o presente estudo apresenta algumas limitações as quais devem ser consideradas na análise e planejamento de estudos futuros. O maior questionamento a ser feito em relação aos resultados é a ausência de testes feno/genotípicos para a confirmação se o tipo bacteriano dos pais é o mesmo dos filhos. Diferentes tecnologias podem ser aplicadas para obterem-se esses resultados, como AP-PCR, genotipagem, e testes fenotípicos (no caso de culturas viáveis). Assim, o próximo passo a ser testado nesse estudo é a caracterização das espécies para confirmação dos resultados. Outra consideração a ser feita é o impacto da idade dos filhos na colonização pelos patógenos (em especial se observado a relação entre idade e presença de *P. gingivalis*). Dever-se-á identificar o impacto da idade das crianças na colonização e se em cada perfil familiar pode haver uma diferente cinética na colonização pelos mesmos. Além do exposto, uma outra consideração a ser realizada é o padrão de higiene e condição periodontal das crianças nas famílias com PAG. Esse resultado inesperado mostrou uma pior condição oral, a qual pode ser relacionada ao padrão familiar de higiene ou a uma

maior susceptibilidade intrínseca desses indivíduos. Dessa forma, um estudo controlando esse fator está sendo planejado e poderá evidenciar o impacto dessa condição nos resultados.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as crianças oriundas de famílias com periodontite agressiva generalizada possuem uma maior colonização por *A. actinomycetemcomitans*, sendo que a detecção deste na cavidade oral dos pais representa um risco 16 vezes maior para a colonização. Entretanto, essa relação de transmissão não foi identificada para outros patógenos periodontais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000*. 2002;29:153-76.
2. Andia DC, Letra A, Casarin RC, Casati MZ, Line SR, de Souza AP. Genetic analysis of the IL8 gene polymorphism (rs4073) in generalized aggressive periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2012 Jun 20.
3. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4:1-6.
4. Asikainen, S., Alaluusua, S. & Saxe'n, L. Recovery of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *Journal of Periodontology* 1991;62:203–206.
5. Asikainen, S., Chen, C., Saarela, M., Saxe'n, L. & Slots, J. Clonal specificity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in destructive periodontal disease. *Clinical Infectious Diseases* 1997;25:S227–S229.
6. Asikainen S, Chen C, Alaluusua S, Slots J. Can one acquire periodontal bacteria and periodontitis from a family member? *J Am Dent Assoc*. 1997;128:1263-71
7. Asikainen S, Chen C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000*. 1999;20:65-81
8. Boutaga, K., Van Winkelhoff, A. J., Vandenbroucke- Grauls, C. M. J. E. & Savelkoul, PHM. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:4950–4954.
9. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of

periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. J Periodontol. 2007 Jan;78(1):79- 86.

10. Casarin RC, Ribeiro Edel P, Mariano FS, Nociti FH Jr, Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2010;45:635-42.

11. Casarin RC, Peloso Ribeiro ED, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. The combination of amoxicillin and metronidazole improves clinical and microbiologic results of one-stage, full-mouth, ultrasonic debridement in aggressive periodontitis treatment. J Periodontol. 2012;83:988-98.

12. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2005;32:860-6.

13. Doğan B, Kipalev AS, Okte E, Sultan N, Asikainen SE. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. J Periodontol. 2008;79:307-15.

14. Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, Gamonal J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. J Periodontol. 2005;76:289-94.

15. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol. 1994 Mar;65(3):260-7.

16. Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE, Ho AW, Koch G, Dunford R, Zambon JJ, Hausmann E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. J Periodontol. 1995 Jan;66(1):23-9.

17. Gunsolley, J. C., Ranney, R. R., Zambon, J. J., Burmeister, J. A. & Schenkein, H.A. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families afflicted with periodontitis. Journal of Periodontology 1990;61:643–648.

18. Haubek D, Ismaili Z, Poulsen S, Ennibi OK, Benzarti N, Baelum V. Association between sharing of toothbrushes, eating and drinking habits and the presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Moroccan adolescents. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20:195-8.
19. Heller D, Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Colombo AP. Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Arch Oral Biol.* 2012;57:973-80.
20. Kleinfelder JW, Müller RF, Lange DE. Intraoral persistence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontally healthy subjects following treatment of diseased family members. *J Clin Periodontol.* 1999;26:583-9.
21. Könönen E, Paju S, Pussinen PJ, Hyvönen M, Di Tella P, Suominen-Taipale L, Knuutila M. Population-based study of salivary carriage of periodontal pathogens in adults. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2446-51.
22. Mestrik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010;37:353-65.
23. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2002;29
24. Petit, M. D., van Steenberghe, T. J. M., de Graaff, J. & van der Velden, U. Transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families of adult periodontitis patients. *Journal Periodontol Research* 1993;28:335–45 (a).
25. Petit, MD, van Steenberghe, TJ, Scholte, LM, van der Velden, U, de Graaff, J. Epidemiology and transmission of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* among children and their family members. A report of 4 surveys. *Journal of Clinical Periodontology* 1993;20: 641–50 (b).

26. Rescala B, Rosalem W Jr, Teles RP, Fischer RG, Haffajee AD, Socransky SS, Gustafsson A, Figueredo CM. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *J Periodontol.* 2010;81:1308-14.
27. Rodenburg, J. P., Van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G., Groene, R. J., Abbas, F. & de Graaff, J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *Journal Clinical Periodontology* 1990;17:392–399.
28. Savitt, ED, Kent RL. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by subject age. *Journal of Periodontology* 1991;62:490–494.
29. Saygun I, Nizam N, Keskiner I, Bal V, Kubar A, Açikel C, Serdar M, Slots J. Salivary infectious agents and periodontal disease status. *J Periodontal Res.* 2011;46:235-9.
30. Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1988;15:85-93.
31. Slots, J, Feik D., Rams, TE. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides intermedus* in human periodontitis: age relationship and mutual association. *Journal of Clinical Periodontology* 1990;17:659–662.
32. Susin C, Albandar JM. Aggressive periodontitis in an urban population in southern Brazil. *J Periodontol.* 2005 Mar;76(3):468-75.
33. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87. Review.
34. Tamura K, Nakano K, Hayashibara T, Nomura R, Fujita K, Shintani S, Ooshima T. Distribution of 10 periodontal bacteria in saliva samples from Japanese children and their mothers. *Arch Oral Biol.* 2006;51:371-7.

35. Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *J Periodontol*. 2003 Oct;74(10):1460-9.
36. Tanaka S, Fakher M, Barbour SE, Schenkein HA, Tew JG. Influence of proinflammatory cytokines on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* specific IgG responses. *J Periodont Res* 2006; 41: 1–9.
37. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):39- 53.
38. Tuite-McDonnell, M., Griffen, A. L., Moeschberger, M. L., Dalton, R. E., Fuertst, P. A, Leys EJ. Concordance of *Porphyromonas gingivalis* colonization in families. *Journal of Clinical Microbiology* 1997;35:455–61.
39. Umeda M, Miwa Z, Takeuchi Y, Ishizuka M, Huang Y, Noguchi K, Tanaka M, Takagi Y, Ishikawa I. The distribution of periodontopathic bacteria among Japanese children and their parents. *J Periodont Res* 2004; 39; 398–404.
40. Van der Velden, U, Abbas F, Armand S, de Graaff J, Timmerman MF, van der Weijden G, Van Winkelhoff AJ, Winkel EG. The effect of sibling relationship on the periodontal condition. *Journal of Clinical Periodontol* 1993;20:683–90.
41. Van Steenberghe, TJ, Petit MD, Scholte LH, van der Velden U, de Graaff J. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. *Journal of Clinical Periodontol* 1993;20:340–5.
42. Van Winkelhoff, A. J., Van der Velden, U., Clement, M. & De Graaff, J. (1988) Intra-oral distribution of black-pigmented *Bacteroides* species in periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology* 3, 83–85.
43. Van Winkelhoff AJ, Boutaga K. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *J Clin Periodontol*. 2005;32:16-27.

44. von Troil-Lindeén B, Saarela M, Mäkitö J, Alaluusua S, Askinainen S. Source of suspected periodontal pathogens re-emerging after periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology* 1996;23:601–7.
45. Zambon JJ, Christersson L, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *Journal of Periodontology* 1993;54:707–11.

COMITÊ DE ÉTICA



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**




CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Avaliação da transmissibilidade de patógenos periodontais em familiares de indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada**", protocolo nº 046/2011, dos pesquisadores Renato Corrêa Viana Casarin e Mabelle de Freitas Monteiro, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02/09/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Evaluation of periodontal pathogens transmission within families of generalized aggressive periodontitis subjects**", register number 046/2011, of Renato Corrêa Viana Casarin and Mabelle de Freitas Monteiro, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 09/02/2011.


Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.