

**Paulo César Tavares**

**AVALIAÇÃO DE PERIODONTOPATÓGENOS EM  
AMOSTRA DE CONVENIÊNCIA DE JOVENS E  
ADULTOS DA CIDADE DE ANÁPOLIS - GO**

Dissertação apresentada para obtenção do  
Título de Mestre pelo Programa de Pós-  
graduação do Departamento de  
Odontologia da Universidade de Taubaté.

Subárea de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Cortelli

**Taubaté - SP**

**2006**

PERIODONTOPATÓGENOS EM AMOSTRA DE CONVENIÊNCIA DE JOVENS E ADULTOS  
DA CIDADE DE ANÁPOLIS – GO

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ - TAUBATÉ, SP.

Data: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ INSTITUIÇÃO \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ INSTITUIÇÃO \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ INSTITUIÇÃO \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho a minha esposa Maria Cristina Landeiro Tavares e minhas filhas Paula Landeiro Tavares e Bruna Landeiro Tavares que incentivaram-me, apoiaram-me nos momentos difíceis nesta etapa de nossas vidas.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS que me deu forças, amparo, saúde para concluir esta importante fase da minha vida.

Aos meus pais Therezinha André Tavares e José Carlos Tavares Filho (“In memoriam”) de quem veio toda inspiração.

Ao Orientador Prof. Dr. José Roberto Cortelli pelo apoio e dedicação nos momentos em que eu estava à deriva e pela orientação deste trabalho.

A Dra. Débora Pallos que se mostrou uma pessoa amiga, cordial e sempre disposta a ajudar.

Ao meu amigo e irmão Marcus Vinícius Moreira de Castro pela ajuda em vários momentos e pelo seu jeito de querer ajudar as pessoas sem pedir nada em troca.

Aos colegas de Mestrado em especial aos Periodontistas: Amilton, Juliano, Marcelo, Mário e Paulo Marçal.

Aos funcionários da UNITAU, em especial, a Alessandra Borges Serra e Adriana Pellogia pela competência e apoio neste Mestrado.

Ao técnico de laboratório Jonas de Carvalho Filho pela grande ajuda, a qual sem ela a nossa pesquisa seria muito mais trabalhosa.

À Bibliotecária Maria Teresa Buono Vieira Osório pela revisão que tornou meu trabalho adequado às normas.

TAVARES, P. C. **Avaliação de periodontopatógenos em amostra de conveniência de jovens e adultos da cidade de Anápolis – GO.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté.

## **Resumo**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* por PCR em 30 indivíduos de 15 a 60 de idade ( $37,80 \pm 11,83$ ) numa amostra de conveniência da cidade de Anápolis-GO. Os dados microbianos foram associados aos parâmetros clínicos dentais e periodontais incluindo dentes perdidos (CPOD), Índices de Placa (IP) e Gengival (IG), Profundidade de Sondagem (PS) e Nível Clínico de Inserção (NCI). A presença bacteriana foi avaliada por ANOVA. PS, NCI, IP e IG pelo teste *t* de *student*. A prevalência isolada e em conjunto (sulco, mucosa e língua) por ANOVA. O número de bactérias pelo teste *t* de *student*. Gênero, faixa etária e hábito de fumar por Wilcoxon ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que não houve diferença estatística dos parâmetros clínicos em relação ao gênero, todavia, isto foi observado nos indivíduos acima de 37 anos em função do nível clínico de inserção (NCI) ou deste mesmo parâmetro em relação ao hábito de fumar. *C. rectus* (97%), *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* (90%), *E. corrodens* (80%) e *P. gingivalis* (37%). *C. rectus* e *A. actinomycetemcomitans* apresentaram maior prevalência na mucosa em relação ao sulco e língua, e *T. forsythia*, *E. corrodens* e *P. gingivalis* maior prevalência no sulco. *P. gingivalis* mostrou-se mais prevalente nos indivíduos acima de 37 anos e com maior perda de inserção clínica (PIC). Após avaliação dos resultados podemos concluir que o número de bactérias presentes foi elevado existindo associação entre *P. gingivalis* com o fator idade e perda de inserção clínica. Não houve distribuição uniforme entre os patógenos e o local da coleta.

**Palavras-chave:** bactéria, epidemiologia, reação em cadeia da polimerase, doença periodontal.

TAVARES, P. C. **Periodontopathogens assessment in a convenient sample of young and adult subjects from Anápolis (Go), Brazil.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté.

### **Abstract**

The aim of this present survey was to evaluate the presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in 30 subjects from 15 to 60 ( $37.80 \pm 11.83$ ) by polymerase chain reaction (PCR). The aim population, like convenience sample, was examined in Anápolis-GO. The study design was performed in clinical and microbial associations, including decay, missing, filling teeth (DMFT), plaque index (PI), gingival index (GI), periodontal pocket depth (PPD) and clinical attachment level (CAL). The presence of microorganisms was evaluated by ANOVA. PI, GI, PPD and CAL by *student t test*. Individual presence or pool (sulci, mucosas and tongue) of microorganisms were consider by ANOVA. *Student t test* examined the number of microorganisms and gender, aging and smoking by Wilcoxon ( $p < 0.05$ ). The results showed that no statistically significant difference was observed according gender, however, clinical attachment level (CAL) was significantly different when subjects more that 37 years old or smoking were take in consideration. The results also showed that the prevalence of microorganisms was: *C. rectus* (97%), *T. forsythia* and *A. actinomycetemcomitans* (90%), *E. corrodens* (80%) and *P. gingivalis* (37%). The microorganisms more prevalent in mucosa than sulci and tongue were *C. rectus* and *A. actinomycetemcomitans*, and *T. forsythia*, *E. corrodens* and *P. gingivalis* more prevalent in sulci. In subjects more than 37 years old or with clinical attachment loss *P. gingivalis* showed more presence. In conclusion we consider that the number of bacteria were high when *P. gingivalis* was considered aging and clinical attachment loss were more observed. Finally, no pattern of distribution were observed relate to microorganisms and sulci, mucosa and tongue.

**Key words:** bacteria, epidemiology, polymerase chain reaction, periodontal disease.

## SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	6
Lista	8
1 Introdução	10
2 Revisão da Literatura	11
2.1 Características gerais das doenças periodontais	11
2.2 Epidemiologia das doenças periodontais	12
2.3 Microrganismos periodontais / características morfológicas	14
2.4 Presença de microrganismos e a doença periodontal	16
2.5 Histopatologia da doença periodontal	20
2.6 Identificação microbiana	21
3 Proposição	26
4 Material e Método	27
4.1 Coleta de dados	27
4.2 Inclusão e exclusão de participantes	27
4.3 Coleta de dados microbiológicos	28
4.4 Exame microbiológico	28
4.5 Procedimentos estatísticos	30
5 Resultados	32
6 Discussão	42
7 Conclusões	49
Referências	50
Apêndice	59
Anexo	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Associação de periodontopatógenos subgingival em indivíduos com doença periodontal. Baseado em Haffajee e Socransky (1994)	19
Figura 2	Prevalência de periodontopatógenos detectados pela técnica da PCR, de acordo com Ashimoto <i>et al.</i> (1996)	24
Figura 3	Microrganismos e <i>primers</i> específicos para a reação em cadeia da polimerase (PCR), de acordo com Ávila-Campos; Velásquez-Meléndez (2002)	30
Figura 4	Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados no presente estudo	34
Figura 5	Distribuição percentual da prevalência de <i>C. rectus</i> em função do local da coleta	35
Figura 6	Distribuição percentual da prevalência de <i>T. forsythia</i> em função do local da coleta	36
Figura 7	Distribuição percentual da prevalência de <i>E. corrodens</i> em função do local da coleta	36
Figura 8	Distribuição percentual da prevalência de <i>A. actinomycetemcomitans</i> em função do local da coleta	37
Figura 9	Distribuição percentual da prevalência de <i>P. gingivalis</i> em função do local da coleta	37
Figura 10	Distribuição percentual da detecção dos periodontopatógenos no sulco, mucosa e língua	38
Figura 11	Distribuição numérica da ocorrência simultânea de periodontopatógenos	38
Figura 12	Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados em função do gênero	39
Figura 13	Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados em função do hábito de fumar	40
Figura 14	Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados em função da faixa etária	40
Figura 15	Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados em função do nível do NCI	41



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	População estudada de acordo com gênero e hábito de fumar	32
Tabela 2	Valores médios de Profundidade de Sondagem - PS (mm), Nível Clínico de Inserção – NCI (mm), Índice de Placa – IP (0/1) e Índice Gengival – IG (0/1), em função do gênero dos indivíduos	33
Tabela 3	Valores médios de Profundidade de Sondagem - PS (mm), Nível Clínico de Inserção – NCI (mm), Índice de Placa – IP (0/1) e Índice Gengival – IG (0/1), em função da faixa etária dos indivíduos	33
Tabela 4	Valores médios de Profundidade de Sondagem - PS (mm), Nível Clínico de Inserção – NCI (mm), Índice de Placa – IP (0/1) e Índice Gengival – IG (0/1), em função do hábito de fumar dos indivíduos	34

## 1 Introdução

A doença periodontal acomete um grande número de indivíduos em todo o mundo. O fator etiológico principal desta doença é o biofilme dental, que promove uma reação inflamatória dos tecidos periodontais de proteção (gengiva livre e inserida) e de suporte (cimento, osso alveolar e ligamento periodontal), em decorrência de processo infeccioso mediado por microrganismos (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY-AAP, 1996).

Costerton *et al.* (1994) propuseram uma organização para o biofilme dental, cujas formações em “cogumelo”, denominadas micro colônias, formam uma unidade estrutural composta por diferentes espécies bacterianas. Os microrganismos anaeróbios estritos aparecem no interior da colônia, enquanto os aeróbios ficam na parte mais superficial, onde há maior disponibilidade de oxigênio. Toda massa deve estar aderida a uma superfície dura não descamativa. A matriz extracelular de polissacarídeos forma um sistema circulatório interno que levam nutrientes e remove metabólitos de todo o sistema.

Genco (1997) descreveu o biofilme dental como agregados de bactérias que se ligam fortemente aos dentes e às superfícies bucais. Possui arquitetura microscópica definida, com células bacterianas dispostas em agrupamentos ou colunas de micro colônias e ainda células epiteliais e algumas células inflamatórias.

A avaliação da presença de periodontopatógenos numa população em geral se justifica pela possibilidade de obtenção dos dados que, uma vez associados aos diferentes parâmetros clínicos periodontais, como, por exemplo, avaliações de profundidade de sondagem e do nível clínico de inserção, caracterizam o perfil periodontal dos indivíduos e ainda estabelecem as necessidades terapêuticas ideais para a manutenção de saúde periodontal. Assim, este estudo se propôs avaliar e associar numa amostra de conveniência da população de Anápolis-GO algumas características clínicas representadas pelos índices de placa e gengival, mensurações de profundidade de sondagem e do nível clínico de inserção, e, microbianas, pela prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*. Sabendo-se que este estudo é inédito nesta região, ele contribuirá decisivamente na organização de políticas de atendimento em saúde bucal do Município.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 Características gerais das doenças periodontais

O termo “doença periodontal” refere-se à gengivite e à periodontite. Gengivite é uma condição inflamatória dos tecidos moles (gengiva) que envolve os dentes e representa uma resposta inflamatória em decorrência da presença de biofilme aderido às superfícies dentais podendo ser modificada por fatores como fumo, certas drogas e mudanças hormonais que ocorrem na puberdade e gravidez (KINANE, 2001).

As doenças periodontais constituem um grupo de doenças infecciosas, associadas aos fatores etiológicos locais e sistêmicos. Dentre estes, o biofilme dental, é considerado o principal fator local causal das doenças (LÖE; THEILADE; JENSEN, 1965; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

Löe, Theilade e Jensen (1965) descreveram as várias fases relativamente distintas da formação do biofilme dental com algumas variações temporais nos diferentes dentes e indivíduos. A primeira fase num período dois dias quando se elimina os métodos clássicos de higiene bucal, havendo proliferação de cocos e bastonetes *Gram* positivos e um aumento de 30% de cocos e bastonetes *Gram* negativos. A segunda fase, de dois a quatro dias é caracterizada pelo aparecimento e aumento do número de fusobacterias e filamentos. A terceira fase, de quatro a nove dias, pelo aparecimento de espiroquetas. Nesse momento, a gengivite passa a ser clinicamente detectável.

A exposição do tecido gengival ao biofilme dental resulta na inflamação do tecido, que manifesta sinais clínicos da gengivite. As características da gengivite são alterações de cor e do contorno gengival, mudança da temperatura intra-sulcular, aumento do exudato gengival, sangramento espontâneo ou provocado (MARIOTTI, 1999).

A periodontite é precedida por gengivite e isto implica que a prevenção da gengivite é também uma medida de prevenção para a periodontite. As limitações do tratamento mecânico no sentido para diminuir ou suprimir microrganismos subgengivais sugerem a utilização de antimicrobianos locais ou sistêmicos para a complementação do tratamento mecânico (DZINK; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1988).

O fator etiológico primário, o biofilme dental, pode ter seu acúmulo aumentado pela presença de fatores locais que facilitam sua retenção. A gengivite

quando não tratada pode evoluir para periodontite crônica. As características clínicas da periodontite crônica são: inflamação gengival, sangramento à sondagem, aumento na profundidade de sondagem, perda de inserção clínica e conseqüente perda óssea alveolar (KINANE; LINDHE, 1999).

A doença periodontal é a maior responsável pela perda de dentes em seres humanos, devido à sua natureza crônica e indolor, desenvolvendo-se de forma gradativa e assintomática. Somente nos últimos estágios, com bolsas profundas e mobilidade dental, ela é percebida (MACHION *et al.*, 2000).

A periodontite é definida como uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, causada por microrganismos específicos, resultando em uma destruição progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar (NOVAK, 2004).

Apesar dos avanços relacionados à etiopatogenia das infecções periodontais, o diagnóstico e a classificação dessas doenças, ainda hoje, baseiam-se, quase inteiramente, na avaliação clínica e no exame radiográfico (LOTUFO; PANNUTI; SARAIVA, 2001). O padrão de perda óssea pode ser vertical, quando a perda de inserção e osso em superfície dental é maior do que acontece na superfície adjacente, ou horizontal, quando a perda de inserção e osso progride a uma taxa uniforme na maioria das superfícies dentais. Normalmente, a perda óssea vertical está associada a defeitos ósseos angulares e formação de bolsas intra-ósseas. A perda óssea horizontal está associada normalmente com bolsas supra-ósseas (NAGY; NOVAK, 2004).

## **2.2 Epidemiologia das doenças periodontais**

Amostra de conveniência é uma amostra de conveniência para nós, ou seja, uma amostra de indivíduos que procuraram a Associação Brasileira de Odontologia de Anápolis-Goiás para tratamento odontológico.

Medronho em 2003 afirmou que estudos epidemiológicos baseiam-se na caracterização de saúde/doença numa população, logo as condições periodontais de um determinado grupo de indivíduos só pode ser determinado a partir do conhecimento epidemiológico. Por definição epidemiologia é o estudo dos determinantes do processo saúde-doença em grupos populacionais ou ainda o estudo da distribuição e dos determinantes de condições relacionadas à saúde ou eventos em populações específicas.

Prevalência é a proporção de pessoas em uma população que tem uma doença em um dado ponto ou período de tempo. É calculada dividindo-se o número de pessoas

na população que têm a doença pelo número total de pessoas da população (GREENBERG, 1996).

Incidência é a porcentagem média de pessoas não afetadas que desenvolverão uma doença durante determinado período de tempo. É calculada dividindo-se o número de novos casos da doença pelo o número de pessoas sob o risco desta doença (ADDY *et al.*, 1994).

Estudos epidemiológicos são executados para investigar a prevalência e a incidência de uma doença, os fatores de risco relacionados a ela, a efetividade e a eficácia das intervenções (ARBES JR; BECK, 2004).

Os estudos observacionais mais comuns são os do tipo transversais ou também chamados estudos seccionais ou de prevalência. Nos estudos transversais, a presença ou ausência de doença e as características dos membros de uma população são verificadas em um determinado momento (ARBES JR; BECK, 2004). Estudos transversais são caracterizados pela observação direta de determinada população selecionada ao acaso em uma oportunidade única. Os objetivos desse tipo de estudo estão relacionados com indivíduos em determinadas épocas. E, esta mesma relação temporal entre causa e efeito também constitui uma de suas principais limitações, pois, informações relativas ao tempo passado dependem da memória do indivíduo. Em algumas situações esta dependência pode determinar um viés de memória com risco de inviabilizar algumas das hipóteses propostas. Por isso, nem sempre se consegue estabelecer com sucesso a relação entre a doença e a exposição temporal aos fatores de risco (ARAÚJO; CORTELLI, 2004).

Flores-de-Jacoby *et al.* (1991) realizaram um estudo das condições periodontais na cidade do Rio de Janeiro com 1854 indivíduos de 15 a 67 anos de idade por meio do Índice de Necessidade de Tratamento Periodontal das Comunidades (INTPC / CPITN). A prevalência da doença periodontal avançada foi de 50% nos indivíduos com mais de 50 anos de idade. Bolsas periodontais maiores do que 6 mm de profundidade foram altamente prevalentes quando comparadas com dados Europeus. Neste estudo não foi observada uma maior predileção da doença pelo fator gênero.

Em estudos realizados numa população gaúcha não tratada, em que foram examinados 401 indivíduos adultos por meio do exame completo de perda de inserção clínica, os autores observaram — para a faixa etária de 40 a 59 anos — 82,3% dos participantes com periodontite, porém apenas 8,9% em grau avançado. Entretanto, a partir dos 60 anos, 66,6% dos indivíduos apresentaram periodontite, sendo 26,7% o

percentual de indivíduos com doença avançada. Concluíram que, a prevalência e gravidade da periodontite estavam diretamente proporcionais à idade até os 59 anos (OPPERMANN; SILVA; BASSANI, 2000).

Albandar em 2002 constatou maior perda de inserção clínica e reabsorção óssea nos indivíduos adultos quando comparados aos jovens. Associou o aumento da idade com o aumento nos valores de perda de inserção clínica. Estes achados foram confirmados por Locker, Slade e Murray (1998) considerando o fato de que, com o aumento da idade aumenta proporcionalmente a chance de perda de inserção clínica, pois aumenta a exposição de diferentes fatores ao longo do tempo.

Susin *et al.* (2004) avaliaram a perda de inserção clínica em adultos brasileiros associando esta condição a fatores demográficos, comportamentais e de exposição numa amostra representativa de 853 indivíduos de 30 a 103 anos de idade. Foram avaliados seis sítios por dente e os resultados mostraram que 79% dos indivíduos apresentavam perda de inserção clínica  $\geq 5$  mm e 52%  $\geq 7$  mm. Indivíduos de 40 a 49 anos de idade apresentavam três vezes mais chances de apresentar perda de inserção clínica moderada quando comparada com controles de 30 a 39 anos de idade. Indivíduos fumantes destacaram-se como portadores de perda de inserção clínica moderada (risco relativo=2,1) ou avançada (risco relativo=3,4) quando comparado a não fumantes. Os autores concluíram que a população alvo apresentou alta ocorrência de perda de inserção clínica.

### **2.3 Microrganismos periodontais / características morfológicas**

*A. actinomycetemcomitans* é um bastonete pequeno, de terminação arredondada, Gram-negativo, imóvel, capnofílico, catalase negativa, sacarolítico (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1999). *A. actinomycetemcomitans* é um importante periodontopatógeno que elabora um grande número de fatores de virulência tais como, fator inibidor da quimiotaxia, fatores imunossupressores, fatores citotóxicos, lipopolissacárides (LPS), colagenases, determinantes de resistência a antibióticos (VAN DYKE *et al.*, 1982). Helgeland e Nordby (1993) demonstraram que *A. actinomycetemcomitans* é capaz de passar através das células epiteliais. Produz leucotoxina, seu principal fator de virulência, que pode interferir no mecanismo de defesa do hospedeiro, capaz de destruir principalmente polimorfos mononucleares

(PMN) e monócitos humanos (VAN DYKE *et al.*, 1982; HIDALGO; ÁVILA-CAMPOS; TREVISAN Jr., 1997).

*A. actinomycetemcomitans* é principalmente isolado de periodontite, podendo ser encontrado em lesões de endocardite e diferentes infecções focais (SLOTS, 1997).

*Porphyromonas gingivalis* é um bastonete anaeróbio, não móvel, assacarolítico, Gram-negativo. Esta bactéria tem apresentado uma atividade proteolítica similar à tripsina, sendo assim BANA positivo (LOESCHE, 1992). *P. gingivalis* tem a capacidade de elaborar várias enzimas proteolíticas que atuam na interface hospedeiro-parasita, contribuindo na patogênese através da degradação dos tecidos dos hospedeiros e na modulação de seus mecanismos de defesa (HAAKE; HUANG, 2004).

*P. gingivalis* depende da sua capacidade proteolítica (colagenase) de degradar o colágeno (proteínas) em pequenos peptídeos que são assimilados e utilizados metabolicamente na produção de energia e, ainda como fontes de carbono e nitrogênio. As enzimas do *P. gingivalis* proteases mais conhecidas como gingipains, ocorrem de múltiplas formas, encontradas extracelularmente ou na superfície da célula bacteriana. Especificamente as gingipains agem nas ligações peptídicas, quebrando as proteínas com formação de resíduos de arginina (arg-gingipains) ou resíduos de lisinas (Lis-gingipains) (HAAKE; HUANG, 2004).

*P. gingivalis* produz uma variedade de fatores de virulência incluindo lipopolissacárides (LPS) (MILLAR *et al.* 1986), fimbrias (YOSHIMURA *et al.*, 1984). Estes fatores são considerados a maior causa de destruição dos tecidos periodontais de maneira indireta através de produção de citocinas pelas células inflamatórias (HAMADA *et al.*, 1988) e pelas células do tecido conjuntivo (TAKADA *et al.*, 1991). Por outro lado, apresentaram efeitos destrutivos diretos tais como citotoxicidade e degradação da membrana do *P. gingivalis* (MATSUDA *et al.*, 1996).

*P. gingivalis* é isolado freqüentemente de amostras bacterianas subgingivais de indivíduos com diversas formas de doença periodontal (KLEIN; GONÇALVES, 2003).

*Eikenella corrodens* é um microrganismo Gram-negativo do tipo bastonete com terminações rombas e regulares, anaeróbio facultativo, assacarolítico. Tem sido reconhecido como patógeno em osteomielites (JOHNSON; PANKEY, 1976). Além disso, esta bactéria foi observada mais frequentemente e em níveis elevados em sítios ativos (DZINK *et al.* 1985). Ashimoto, *et al.* (1996) usando a técnica do PCR para determinar a prevalência de vários microrganismos encontrou uma prevalência de 70%

desta bactéria em pacientes com periodontite avançada. Lopez, Melhado e Leighton (1996) detectaram a presença deste patógeno em 80% de indivíduos diagnosticados com periodontite de início precoce. Por outro lado, Moore *et al.* (1985) observaram *E. corrodens* nas mesmas proporções, em indivíduos com gengivite ou em condições periodontais saudáveis. *E. corrodens* foi observada mais freqüentemente em sítios de destruição periodontal, quando comparado com sítios sadios (YUAN *et al.* 2001).

*Tanarella forsythia*, anteriormente denominada *T. forsythensis*, *Bacteroides forsythus*, é um microrganismo fusiforme, Gram-negativo, estritamente anaeróbio, não formador de esporos, imóvel, não fermentador de carboidratos. Foi encontrado frequentemente em maior número em lesões periodontais ativas que em lesões inativas (DZINK, SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1988). Indivíduos que apresentavam este microrganismo mostravam-se mais susceptíveis a perda óssea alveolar, perda de inserção clínica e perda dental comparados com indivíduos onde a espécie não foi detectada (MACHTEI *et al.*, 1999). Esta bactéria tem apresentado uma atividade proteolítica similar à tripsina, sendo assim BANA positivo (LOESCHE, 1992). Ishikura (2003) demonstrou que a sialidase modifica uma variedade de atividades associada ao hospedeiro que resulta na modificação da capacidade de resposta a infecção bacteriana e poderia ser um importante fator de virulência do *T. forsythia*. Portanto, pouco é conhecido sobre este microrganismo. Foi o microrganismo mais presente (86%) usando teste do PCR em doença periodontal avançada (ASHIMOTO *et al.*, 1996). Este microrganismo tem sido associado tanto à periodontite crônica quanto à agressiva (SAKAMOTO *et al.*, 2002).

*Campylobacter rectus* é um microrganismo anaeróbio, Gram-negativo, com mobilidade, cujas células apresentam-se com extremidades arredondadas ou achatadas, possuindo morfologias curvas, retas ou helicoidais. *C. rectus* ocorre em números aumentados em indivíduos com periodontite crônica e, foram microrganismos mais prevalentes em sítios com doença periodontal quando comparados a indivíduos saudáveis (TEMPRO *et al.*, 1997).

## **2.4 Presença de microrganismos e a doença periodontal**

A cavidade bucal humana é habitada por mais de quinhentas espécies bacterianas (PASTER, 2001). Enquanto a maioria são comensais, uma pequena parte destas são patógenos oportunistas, podendo causar doença periodontal (SOCRANSKY;



HAFFAJEE, 1994). *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *F. nucleatum* foram as bactérias mais encontradas em portadores de periodontite que em indivíduos saudáveis. São todos periodontopatógenos significantes para doença periodontal crônica em adultos (VAN WINKELHOFF *et al.*, 2002).

Microrganismos específicos têm sido associados às áreas de perda de inserção clínica e aumento da idade (LISTGARTEN; LAI; YOUNG, 1993). Outros estudos relacionam diferentes microrganismos como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, e *A. actinomycetemcomitans* à doença periodontal (DZINK; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1988).

Gmür, Strub e Guggenheim em 1989, descreveram uma forte relação entre *T. forsythia* e *P. gingivalis* em amostras subgengivais em indivíduos adultos com diferentes profundidades de sondagem. Ambas as espécies foram detectadas mais frequentemente e em maior número, em bolsas periodontais profundas.

Dois importantes estudos relataram associação entre bolsas periodontais e presença de *P. gingivalis*, sugerindo seu papel na etiologia e progressão da doença periodontal (SLOTS, 1986; TAKEUCHI *et al.*, 2001). Socransky e Haffajee (1994) relataram a ocorrência de *T. forsythia* em áreas de doença periodontal destrutiva.

De acordo com Socransky *et al.* (1988) *T. forsythia* e *P. gingivalis* aumentam em prevalência e em número com o aumento da profundidade de sondagem. Além disso, o complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) foi fortemente associado com sangramento à sondagem. O interesse nos testes microbiológicos para identificar periodontopatógenos é baseado nos dados que implicam vários microrganismos subgengivais na patogênese da doença periodontal. Os principais microrganismos ligados com lesões destrutivas periodontais são *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. denticola* (ZAMBON, 1996). Uma grande proporção de doenças periodontais em progressão tem sido associada com presença ou níveis elevados de duas espécies: *P. gingivalis* e *T. forsythia* (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1994; ALPAGOT, 1996). A presença destes patógenos específicos, combinados com outras características gerais — extensão das lesões, tipo de tratamento e espaço de tempo entre as manutenções — pode indicar risco futuro para a doença (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994).

Dzink, Socransky e Haffajee (1988) concluíram que diferentes microrganismos como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, e *A. actinomycetemcomitans* estão relacionados à doença periodontal. Portanto, o procedimento clínico deveria basear-se

na identificação e tratamento da infecção estabelecida, assim como na prevenção de sua recorrência. O controle do biofilme poderia aumentar a eficiência do tratamento (LOTUFO; PANNUTI; SARAIVA, 2001).

Rodenburg *et al.* (1990) estudaram 242 indivíduos incluindo 138 com periodontite avançada não tratada e 104 com sítios de doença periodontal refratária ao tratamento clínico, onde avaliaram a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em amostras subgingivais de lesões periodontais. Dos não tratados, 97% apresentaram uma ou mais das espécies estudadas. Neste grupo, a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* foi 54%, 48% e 63%, respectivamente. A ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* no grupo com sítios de doença periodontal refratária ao tratamento foi de 55%, 27% e 59%, respectivamente. Uma diferença estatisticamente significativa na prevalência do *P. gingivalis* foi entre os não tratados e aqueles sítios de doença periodontal refratária ao tratamento clínico. Nos dois grupos a proporção de *A. actinomycetemcomitans* foi estatisticamente significativa em indivíduos com esta bactéria como único microrganismo indicador em comparação com os infectados com *A. actinomycetemcomitans* juntos com espécies de *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

Haffajee e Socransky (1994) associaram o biofilme dental com a progressão da doença periodontal. Espécies como *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, e *T. denticola* têm sido, dentre centenas presentes no ambiente subgingival, relacionadas às doenças periodontais com diversos graus de associação (Figura1).

Zambon (1996) sugeriu que a *T. forsythia* e *P. gingivalis* são fortemente associadas com a patogênese da periodontite, perda de tecido conjuntivo e reabsorção severa do osso alveolar.

Tran *et al.* (2001) fizeram um estudo longitudinal num grupo de 205 indivíduos com baixa prevalência e com periodontite crônica avançada e acompanharam mudanças microbiológicas no desenvolvimento da periodontite. Estes indivíduos tinham visitado seus dentistas para exame e profilaxia nos últimos seis meses, e participavam de um programa de manutenção. Noventa e seis por cento relataram escovarem os dentes pelo menos uma vez por dia e quarenta por cento usavam fio dental. Foi coletado biofilme subgingival das superfícies proximais do sextante posterior de seis em seis meses por dois anos. Todas as amostras analisadas apresentaram *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *P. gingivalis*. Os indivíduos tinham alta

prevalência desses três periodontopatógenos. A presença de uma dessas três espécies poderia prever uma futura perda de inserção na área específica. Portanto, indivíduos com presença persistente de *T. forsythia* em qualquer área em todas as visitas tinham 5,3 vezes maior chance de ter pelo menos uma área na boca perdendo inserção comparando com indivíduos com ocasional ou nenhuma presença de *T. forsythia*. Concluíram que a persistência de *T. forsythia* indica indivíduos com alto risco, porém não necessariamente sítios específicos com perda de inserção.

++++	+++	++	<b>Sob Investigação</b>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>  <i>P. Gingivalis</i>	<i>T. forsythia</i> <i>P. intermedia</i> <i>T. denticola</i>	<i>S. intermedius</i> <i>P. negresens</i> <i>M. micros</i> <i>F. nucleatum</i> <i>C. rectus</i> <i>E. corrodens</i>	<i>Selenomonas spp.</i> <i>Enterobacterias</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>D. pneumosintes</i>

Figura 1 - Associação de periodontopatógenos subgingival em indivíduos com doença periodontal. Baseado em Haffajee e Socransky (1994).

++++ - Muito forte  
+++ - Forte  
++ - Moderada

López *et al.* (2004) avaliaram uma associação entre raça/etnia e a composição da microbiota subgingival encontrada na periodontite crônica. Um estudo foi executado para determinar as características da microbiota subgingival da periodontite crônica de chilenos residentes em Santiago do Chile. Vinte e seis indivíduos foram selecionados (média de idade  $47 \pm 7$  anos) com periodontite crônica, média de profundidade de sondagem  $2,63 \pm 0,5$  mm, média de perda clínica de inserção  $3,70 \pm 0,77$  mm, e com história de terapia periodontal. Amostras de biofilme dental subgingival foram colhidas da face mesial de todos os dentes e avaliado pela presença, nível de infestação, e proporção de 40 bactérias usando sonda de ácido desoxirribonucléico (DNA) e *checkerboard DNA-DNA hibridization*. Dados microbianos dos Chilenos foram comparados com dados de 115 indivíduos de Americanos com periodontite crônica. Os resultados mostraram que cada bactéria testada estava presente pelo menos em 25 dos 26 indivíduos, e 12 indivíduos (46,1%) tinham as 40 bactérias. Todas as espécies testadas estavam presentes em mais de 75% dos locais, e 25 espécies presentes em 90 %

ou mais dos locais incluindo espécies colonizadas em lesões periodontais avançadas. Dezesseis das quarenta bactérias foram significativamente diferentes entre chilenos e americanos. Complexos vermelhos, amarelos e outros complexos foram significativamente maiores em chilenos, e *Actinomyces* foram maiores nos americanos. Os autores concluíram que composição do biofilme dental subgengival foi diferente entre indivíduos de países diferentes. Assim, cuidados devem ser tomados quando extrapolamos os achados de um estudo para diferentes grupos étnicos.

Cortelli *et al.* (2005) avaliaram a presença de *A. actinomycetemcomitans* (de máxima e mínima leucotoxicidade) e *P. gingivalis* em 25 indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva e em 178 com periodontite crônica. Os resultados mostraram que o número de indivíduos que alocaram *P. gingivalis* foi similar a de outras populações latino-americanas e *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade foi maior na população estudada quando comparada a outras populações e esteve associada ao diagnóstico de periodontite agressiva e a bolsas periodontais maiores do que seis mm de profundidade. Os autores concluíram que existe diferença na prevalência de alguns periodontopatógenos entre populações e *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade esteve associada com bolsas periodontais profundas.

## **2.5 Histopatologia da doença periodontal**

Microrganismos periodontais produzem uma variedade de enzimas e toxinas que iniciam o processo inflamatório e o conseqüente dano aos tecidos periodontais. Suas enzimas provocam um colapso nas substâncias extracelulares tais como colágeno e nas membranas das células do hospedeiro a fim de produzir nutrientes para o seu crescimento. Muitas das superfícies das moléculas de proteínas das bactérias são capazes de estimularem uma resposta imune do hospedeiro e também são capazes de criarem inflamação local do tecido (DARVEAU; TANNER; PAGE, 1997). Portanto, os microrganismos danificam os tecidos do hospedeiro, estimulam respostas inflamatórias e imunes, mas seus principais objetivos são: multiplicar, crescer, e sobreviver no interior das bolsas periodontais. Uma vez iniciados estes processos inflamatórios e imunes, várias moléculas inflamatórias tais como proteases, citocinas, prostaglandinas e enzimas do hospedeiro são liberadas dos leucócitos e fibroblastos ou das células estruturais dos tecidos (GEMMELL; MARSHALL; SEYMOUR, 1997). As proteases

tendem a quebrar a estrutura do colágeno e assim, criar espaços para promover infiltração de leucócitos. O colapso do tecido procede largamente sob controle do hospedeiro. Tecidos periodontais tornam-se frouxamente aderidos à superfície dental. Na periodontite, como o tecido conjuntivo é destruído, as células epiteliais proliferam apicalmente junto à superfície da raiz e a bolsa torna-se mais profunda. Com o aumento na profundidade da bolsa periodontal, ocorre então aumento no infiltrado inflamatório do tecido. O acúmulo de biofilme dental subgengival aumenta e, além disso, existe um aumento da densidade microbiana para promover a destruição dos tecidos periodontais. Em bolsas profundas, a microbiota torna-se mais anaeróbia e a resposta do hospedeiro torna-se mais destrutiva e crônica. Eventualmente, a lesão periodontal progride de tal extensão que a perda dental torna-se inevitável (KINANE, 2001).

Para colonizar áreas subgengivais, microrganismos devem ser capazes de: se fixar-se aos tecidos periodontais, multiplicar-se, competirem com outros microrganismos, e ainda neutralizar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Substâncias do fluido gengival ajudam a prevenir a colonização e podem bloquear a ligação das células bacterianas ao dente e superfícies teciduais. Alguns constituintes da saliva e do fluido gengival podem precipitar bactérias e matá-las (KINANE, 2001).

## **2.6 Identificação microbiana**

Na literatura encontramos várias técnicas de detecção bacteriana. Microscopia, culturas, testes enzimáticos, teste imunológicos, sondas de DNA, e reação em cadeia da polimerase (PCR) estão entre as mais utilizadas. Cada uma destas metodologias apresenta limitações, vantagens e desvantagens (LOTUFO; PANNUTI; SARAIVA, 2001). Savitt *et al.* (1988) compararam os métodos de cultura e análise de sonda de DNA para detectar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, e *P. intermedia* em amostras de biofilme dental subgengival. As amostras foram coletadas de áreas gengivais de pacientes diagnosticados como saudáveis, com evidência de gengivite, periodontite agressiva ou periodontite crônica. O número desses patógenos foi determinado usando meios microbiológicos e testes bioquímicos. Os resultados foram então comparados aos números obtidos da análise de sonda de DNA espécie específica. Em sessenta amostras do grupo de doentes, análise de sonda DNA demonstrou 100% de efetividade na detecção do *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*, além de 91% de na detecção do *P. gingivalis*. Os testes de sonda do DNA frequentemente identificaram

esses patógenos em amostras que foram negativas na cultura. Os resultados sugerem que tecnologicamente a análise de sonda de DNA é superior ao método de cultura para a detecção do *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, e *P. intermedia* em biofilme subgingival de humanos.

Técnicas de culturas de bactérias tem sido o método clássico para detecção de microrganismos envolvidos na doença periodontal. Porém, esta técnica envolve procedimentos que podem ser inadequados para o crescimento de algumas bactérias anaeróbias. Este método requer que amostras sejam imediatamente processadas para aquisição máxima de bactérias sobreviventes. O método é muito trabalhoso e só pode identificar microrganismos junto com testes bioquímicos tais como fermentação de açúcar e análises da atividade enzimática bacteriana (SAVITT *et al.*, 1988). Métodos de cultura anaeróbia são usados para detectar a maioria dos microrganismos do biofilme dental subgingival e determinar *in vitro* a susceptibilidade antimicrobiana de microrganismos bucais. Por outro lado, o método de cultura pode apresentar nível reduzido de sensibilidade na detecção de alguns patógenos (BOUTAGA *et al.*, 2003) e a impossibilidade de cultivo de alguns patógenos como a *T. forsythia* e a demora na obtenção dos resultados (SAKAMOTO *et al.*, 2002; LOOMER, 2004).

As vantagens da cultura são: possibilita contagens relativas e absolutas das espécies e capacidade de avaliar a susceptibilidade a antibióticos (SOCRANSKY *et al.*, 1987). As desvantagens são: 1- crescimento só de bactérias viáveis; 2- rigorosa amostragem; 3- necessidade de condições adequadas de transporte; 4- a sensibilidade da cultura bacteriana pode ser baixa; 5- requer equipamento específico; 6- requer pessoal experiente; 7- é relativamente caro e demorado (SANZ *et al.*, 2004).

Testes enzimáticos foram desenvolvidos para detectar bactérias que possuem a enzima tripsina tais como *T. forsythia*, *T. denticola* e *P.gingivalis*. Quando uma amostra de placa que contém qualquer combinação dessas bactérias é colocado numa tira de papel impregnado com um substrato incolor *N-benzoil-DL-arginine-2-naphthamide* (BANA), o substrato de BANA quebra e produz uma cor que vai do azul até a cor preta, cuja intensidade é proporcional ao total da quantidade dos três microrganismos. Este teste é incapaz de avaliar a proporção das três bactérias e nem identificar a presença de outros microrganismos (LOOMER, 2004). A simplicidade, rapidez da resposta e a facilidade de leitura usada fazem deste método de diagnóstico enzimático ideal para uso clínico. A falta de provas clínicas apropriadas para validar a utilidade de seu diagnóstico e seus problemas intrínsecos considerando baixa

sensibilidade (*Evalusite*®) e baixa especificidade (*Perioscan*®) fé-lo desaparecer do mercado (SANZ *et al.* 2004).

Os testes imunológicos que usam anticorpos que reconhece antígenos bacterianos específicos e a identificação destas reações específicas antígeno-anticorpo permitem detecção de microrganismos alvos (SANZ *et al.* 2004). Vários testes estão disponíveis comercialmente, incluindo a imunofluorescência microscópica direta e indireta, *Enzime-linked imunosorbent assay* (ELISA), teste de aglutinação do látex, citofluorografia. O método tem muitas vantagens importantes incluindo baixo custo, mas não permitem avaliação da sensibilidade antibiótica dos microrganismos (LOOMER, 2004).

O teste do ácido nucléico consiste da seqüência do ácido nucléico que são classificados com um marcador colorimétrico radioativo ou enzimático que liga nas seqüências do ácido nucléico do microrganismo correspondente. Este teste pode ser todo genoma, seqüências aleatoriamente clonadas do ácido nucléico ou oligonucleotídios sintéticos. Dos três o teste oligonucleotídio é que tem a maior especificidade e a mais baixa reatividade cruzada por que eles especificam genes alvos para uma espécie bacteriana. É usado para a análise microbiana do biofilme que foi confirmado ter maior sensibilidade que métodos de culturas. Além disso, a vantagem deste teste é que após a coleta das amostras do biofilme não é necessário ser processada imediatamente (LOOMER, 2004).

Métodos moleculares são largamente utilizados para identificação de amostras bacterianas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido largamente utilizada na área biológica. De janeiro de 1994 a janeiro de 2006 mais de 189 mil artigos publicados utilizando esta ferramenta como meio de pesquisa (NCBI — PUBMED, 2006). Em odontologia, e especialmente na periodontia, a PCR tem sido usada para identificação de periodontopatógenos em espécies subgingivais (SLOTS; ASHIMOTO; FLYNN, 1995) e para desvendar o papel das bactérias específicas na doença periodontal devido à detecção precisa de espécies. A PCR permite também a replicação de várias cópias do DNA (LOOMER, 2004).

Desde 1990, o teste da reação em cadeia da polimerase tem sido usado com alto nível de sensibilidade e tem sido de grande sucesso para identificar periodontopatógenos de biofilme subgingival ((WATANABE; FROMMEL, 1993; SLOTS; ASHIMOTO; FLYNN, 1995; ASHIMOTO *et al.*, 1996; KLEIN; GONÇALVES, 2003; LOOMER, 2004).

Sanz *et al.* em 2004, estudando métodos de detecção de microrganismos afirmaram que não existe um único método de diagnóstico microbiológico que demonstra característica ideal e que a escolha de teste deve basear: 1- na sensibilidade e na especificidade; 2- na disponibilidade e no custo; A técnica de cultura é capaz de estudar susceptibilidade antimicrobiana e as técnicas moleculares podem permitir detecção de bactérias não cultiváveis. Cultura bacteriana ainda é o *gold standart*. Contudo, avanços na tecnologia PCR quantitativo pode ter um importante papel no futuro, uma vez que isto tem sido totalmente validado com processos clínicos bem projetados e seus custos tem sido reduzido com mais tecnologia disponível.

Riggio *et al.* (1996) comparando métodos de culturas e PCR concluíram que a PCR é um método mais preciso que os métodos de culturas para a identificação dos periodontopatógenos *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*.

Ashimoto, *et al.* (1996) usaram esta técnica para determinar a prevalência do *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. denticola* em amostras subgingivais de 50 indivíduos com periodontite avançada, 50 indivíduos com gengivite em adulto e 50 indivíduos com gengivite em crianças (Figura 2).

	<b>Periodontite avançada</b>	<b>Gengivite em adulto</b>	<b>Gengivite em crianças</b>
<i>Actinobacillus actinoyicetemcomitans</i>	30%	14%	14%
<i>Tannerella forsythia</i>	86%	18%	8%
<i>Campylobacter rectus</i>	74%	52%	78%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	74%	10%	14%
<i>Prevotella intermedia</i>	58%	12%	18%
<i>Prevotella nigrescens</i>	52%	20%	22%
<i>Treponema denticola</i>	54%	16%	16%
<i>Eikenela corrodens</i>	70%	10%	14%

Figura 2 - Prevalência de periodontopatógenos detectados pela técnica da PCR, de acordo com Ashimoto *et al.* (1996).

Klein e Gonçalves (2003) estudaram a prevalência de *T. forsythia* e *P.*



*gingivalis* em amostra de biofilme dental subgingival utilizando a reação em cadeia da polimerase e estabeleceram a relação dessas bactérias com doença e saúde periodontal. Indivíduos foram distribuídos em três grupos de acordo com seu diagnóstico periodontal: grupo 1, periodontalmente sadio (n=10); grupo 2, periodontite com profundidade de sondagem  $\leq 5$  mm (n=10); grupo 3, periodontite com profundidade de sondagem  $> 5$  mm (n=10). Indivíduos dos grupos 2 e 3 tinham locais de saúde e doença periodontal. Amostras de biofilme subgingival foram obtidas com pontas de papel absorventes esterilizadas inseridas dentro das bolsas periodontais (áreas com periodontite) e dentro do sulco gengival saudável do mesmo indivíduo. *T. forsythia* não foi detectada em nenhuma amostra de locais saudáveis em nenhum grupo. *P. gingivalis* foi detectado em somente uma amostra de uma área saudável (grupo 2). Os resultados indicaram uma possível associação entre doença periodontal e prevalência de *T. forsythia* e/ou *P. gingivalis*.

### **3 Proposição**

O objetivo do presente estudo foi de avaliar a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Tannerella forsythia* em indivíduos jovens e adultos provenientes de uma amostra de conveniência da população de Anápolis-GO.

## **4 Material e método**

Este estudo do tipo transversal examinou indivíduos jovens e adultos de uma amostra de conveniência dos habitantes da cidade de Anápolis-GO. O presente trabalho avaliou 30 indivíduos selecionados aleatoriamente de uma amostra original de 250 indivíduos conjuntamente examinados sob aspectos clínicos periodontais. No presente estudo adotou-se o critério aleatório estabelecendo-se como método a escolha de um exame microbiano de dentes previamente selecionados para cada oito indivíduos avaliados clinicamente. Os dados microbianos foram confrontados com parâmetros clínicos periodontais incluindo índices de placa e gengival dicotômico (0/1), profundidade de sondagem e nível clínico de inserção.

### **4.1 Coleta de dados**

Foi inicialmente explicado o tipo de estudo desenvolvido (Anexo A) e em seguida os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TECLE) (Anexo B). Todos os sujeitos da pesquisa responderam a um questionário de anamnese (história médico-odontológica, hábitos e comportamentos, além de características demográficas) (Anexo C). Após estes procedimentos foram submetidos aos exames clínicos odontológicos, feito por um examinador previamente treinado e calibrado.

### **4.2 Inclusão e exclusão de participantes**

Após a seleção dos indivíduos recrutados dentre aqueles que têm inscrição nas clínicas odontológicas da ABO-Anápolis-GO, os indivíduos incluídos no presente estudo foram aqueles que se apresentaram com as seguintes características:

- 1) Idade superior a 15 anos,
- 2) Indivíduos indicados para tratamento odontológico na Associação Brasileira de Odontologia de Anápolis – Go.
- 3) Disponibilidade para o exame no dia e horário, indicados pelo funcionário da clínica responsável pela marcação das consultas,

Os indivíduos que apresentaram problemas renais ou diálise, tomavam medicamentos anticoagulantes — exceto aspirina — hemofílicos ou ainda que

foram informados (as) por profissionais de saúde que não deveriam se submeter ao exame ou tratamento odontológico foram excluídos do experimento, bem como, os indivíduos submetidos a antibioticoterapia sistêmica três meses antes do início do estudo.

### 4.3 Coleta de dados microbiológicos

O responsável pelo estudo foi previamente treinado e calibrado para a coleta microbiana na clínica de graduação da Faculdade de Odontologia de GURUPI. O mesmo recebeu um treinamento específico em técnicas de reação em cadeia da polimerase no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Básico de Biociências da UNITAU. A calibração clínica intra-examinador foi baseada em Araujo *et al.* (2003) usando o teste estatístico EPM (erro padrão da medida), e tendo um examinador padrão como referência.

### 4.4 Exame microbiológico

Após a realização dos exames clínicos periodontais na amostra original, foram coletadas amostras bacterianas do sulco/bolsa gengival das faces méso-vestibulares dos dentes 16, 14, 12, 21, 24, 26, 36, 34, 32, 41, 44 e 46 para avaliar a presença dos microrganismos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *C. rectus* e *T. forsythia*.

Procedimentos: após isolamento relativo com roletes de gaze esterilizada e remoção do biofilme/placa dental supragengival, um cone de papel número 30 (Dentsply®) foi inserido no sulco/bolsa gengival dos dentes selecionados onde foi mantido por 60 segundos. Coletamos também amostras da bochecha e dorso da língua com *swab* estéril. Em seguida, os cones de papel, bem como os *swabs* foram agrupados de acordo com o arco dentário, superior ou inferior, dorso da língua e bochecha e colocados em micro tubo contendo 1mL de solução de Ringer reduzida e estocados a  $-4^{\circ}\text{C}$ . O DNA das amostras foi isolado utilizando-se matriz comercial de purificação (Instagene, BioRad®) e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

As amostras bacterianas foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Básico de Biociências da UNITAU. Inicialmente realizou a

homogeneização do material contido nos micro tubos em agitador mecânico (Vortex®, Phoenix, AP56) por sessenta segundos. Com o auxílio de micropipetas (Eppendorf®) 0,5 mL da amostra original foi removida de cada micro tubo e utilizando-se outro micro tubo foi adicionado 0,5 mL de água destilada, perfazendo um total de 1,0 mL. Este material foi então centrifugado por 4690 x g por três minutos em microcentrífuga (Sanyo®). A partir de então o sobrenadante foi cuidadosamente removido deixando de 0,2 a 0,3 mL no fundo do micro tubo para não desorganizar o *pellet*. Adicionou-se 0,2 mL da matriz *Instagene* (Bio-Rad®), matriz de extração e purificação de DNA, incubando a 56°C em banho-maria (Quimis®) por 30 minutos. Em seguida, o material foi novamente homogeneizado (15 seg.) e então mantido por oito minutos em banho-maria à temperatura de 100°C. O material foi novamente homogeneizado (15 seg.) e centrifugado por três minutos a 4690 x g.

Após a extração do DNA, utilizou-se oligonucleotídeo iniciador (*primer*) para a proteína  $\beta$ -actina humana com auxílio do termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®).

Em seguida, a confirmação da extração do DNA as amostras foram amplificadas por primers específicos (Figura 3) de acordo com Ávila-Campos; Velásquez-Meléndez, 2002.

Depois do procedimento de amplificação a detecção do produto da PCR foi realizada por eletroforese (Horizon® 11-14) em gel de agarose a 1%, contendo 40 mL de solução tamponada e 0,40g de agarose, visualizado à luz ultravioleta pela adição de brometo de etídio (30 $\mu$ L) como corante fluorescente. Os géis obtidos foram fotografados e analisados em comparação aos produtos amplificados de cepas padrão cedido pelo Instituto Fio Cruz, RJ.

Microrganismo	Primer
<i>A. Actinomycetemcomitans</i>	GCTAATACCGCGTAGAGTCGG ATTTCACACCTCACTTAAAGGT
<i>P. gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG ACTGTTAGCAACTACCGATGT
<i>Eikenella corrodens</i>	CTAATACCGCATACGTCCTAAG CTACTAAGCAATCAAGTTGCCC
<i>T. forsythia</i>	GCGTATGTAACCTGCCCCGCA TGCTTCAGTGTCAGTTACACCT
<i>C. rectus</i>	TTTCGGAGCGTAAACTCCTTTTC TTTCTGCAAGCAGACACTCTT
Controle <i>Beta-actina</i>	CGTGACATAAAGAGAAGCTGTGC ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAG

Figura 3 - Microrganismos e *primers* específicos para a reação em cadeia da polimerase (PCR), de acordo com Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002)

#### 4.5 Procedimentos estatísticos

Coleta e tabulação dos dados: A coleta de dados seguiu as seguintes etapas:

- 1) Determinação da amostra e recrutamento dos participantes,
- 2) Codificação dos arquivos. Para isso usamos o número de prontuário, para manter a identidade dos indivíduos em sigilo,
- 3) Codificação das fichas de diagnóstico, considerando-se as variáveis de interesse. Um livro código foi elaborado para que os dados das fichas sejam tabulados de forma que o sigilo seja mantido,
- 4) Formulação de uma base de dados com variáveis referentes aos dados encontrados no questionário e nas fichas de exame odontológico,
- 5) Tabulação dos dados,
- 6) Formulação da base analítica dos dados.

Análise estatística: A associação entre a presença dos diferentes patógenos examinados foi realizada por Análise de Variância (ANOVA). Os parâmetros periodontais, PS, NCI, IP e IG foram avaliados pelo teste *t* de *student*. A prevalência bacteriana avaliadas isoladamente ou em conjunto na dependência do sítio de coleta

(sulco, mucosa e língua) foram avaliadas por ANOVA. A avaliação da ocorrência do número de bactérias de zero a cinco simultâneas foi feita pelo teste  $t$  de student. Finalmente o gênero, faixa etária e hábito de fumar foram avaliados pelo teste de Wilcoxon. Para esta análise levou-se em consideração a significância de 95%.

## 5 Resultados

A distribuição da população estudada, em função do gênero e hábito de fumar está expressa na tabela 1.

A média dos valores de PS, NCI, IP e IG dos indivíduos de acordo com o gênero, faixa etária e hábito de fumar estão expressos respectivamente nas tabelas 2, 3 e 4. Foi observada diferença estatisticamente significativa para NCI em função da faixa etária (Tabela 3) e hábito de fumar (Tabela 4), onde os indivíduos fumantes e com maior faixa etária apresentaram maiores valores médios de NCI. O Gênero não apresentou interferência em nenhum dos parâmetros periodontais avaliados ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1 – População estudada de acordo com gênero e hábito de fumar

	Fumante (Média idade $\pm$ DP)	Não Fumante (Média idade $\pm$ DP)	Total (Média idade $\pm$ DP)
Masculino	4 (38,78 $\pm$ 9,25)	6 (38,09 $\pm$ 11,24)	10 (37,40 $\pm$ 14,98)
Feminino	3 (39,03 $\pm$ 8,98)	17 (37,72 $\pm$ 7,99)	20 (38,31 $\pm$ 10,36)
Total	7 (39,29 $\pm$ 10,83)	23 (37,35 $\pm$ 12,32)	30 (37,80 $\pm$ 11,83)

DP – Desvio padrão



Tabela 2 – Valores médios de Profundidade de Sondagem - PS (mm), Nível Clínico de Inserção – NCI (mm), Índice de Placa – IP (0/1) e Índice Gengival – IG (0/1), em função do gênero dos indivíduos

	PS (Média ± DP)	NCI (Média ± DP)	IP (Média ± DP)	IG (Média ± DP)
Masculino	2,51 ± 0,68	2,96 ± 1,13	0,84 ± 0,21	0,54 ± 0,28
Feminino	2,52 ± 0,54	2,53 ± 0,81	0,86 ± 0,16	0,74 ± 0,50
TOTAL	2,52 ± 0,58	2,67 ± 0,93	0,85 ± 0,17	0,69 ± 0,45

DP – Desvio padrão;

Tabela 3 – Valores médios de Profundidade de Sondagem - PS (mm), Nível Clínico de Inserção – NCI (mm), Índice de Placa – IP (0/1) e Índice Gengival – IG (0/1), em função da faixa etária dos indivíduos

	PS (Média ± DP)	NCI (Média ± DP)	IP (Média ± DP)	IG (Média ± DP)
≤ 37 anos	2,34 ± 0,60	2,21 ± 0,89	0,85 ± 0,16	0,59 ± 0,21
> 37 anos	2,70 ± 0,52	3,13 ± 0,74 *	0,86 ± 0,19	0,80 ± 0,59
TOTAL	2,52 ± 0,58	2,67 ± 0,93	0,85 ± 0,17	0,69 ± 0,45

DP – Desvio padrão; \* - Diferença estatisticamente significativa (p<0,05)

Tabela 4 – Valores médios de Profundidade de Sondagem - PS (mm), Nível Clínico de Inserção – NCI (mm), Índice de Placa – IP (0/1) e Índice Gengival – IG (0/1), em função do hábito de fumar dos indivíduos

	PS (Média ± DP)	NCI (Média ± DP)	IP (Média ± DP)	IG (Média ± DP)
Fumante	2,59 ± 0,68	3,14 ± 1,03 *	0,96 ± 0,06	0,73 ± 0,20
Não Fumante	2,49 ± 0,54	2,53 ± 0,85	0,82 ± 0,80	0,68 ± 0,50
TOTAL	2,52 ± 0,58	2,67 ± 0,93	0,85 ± 0,17	0,69 ± 0,45

DP – Desvio padrão; \* - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

A leitura dos géis de agarose mostrou que, independente do local de coleta, no total de indivíduos avaliados, *C. rectus* apresentou a maior ( $p < 0,05$ ) prevalência (97%) entre os periodontopatógenos pesquisados, seguido por *T. forsythia* (90%) e *A. actinomycetemcomitans* (90%), depois *E. corrodens* (80%) e finalmente *P. gingivalis* (37%) (Figura 4).

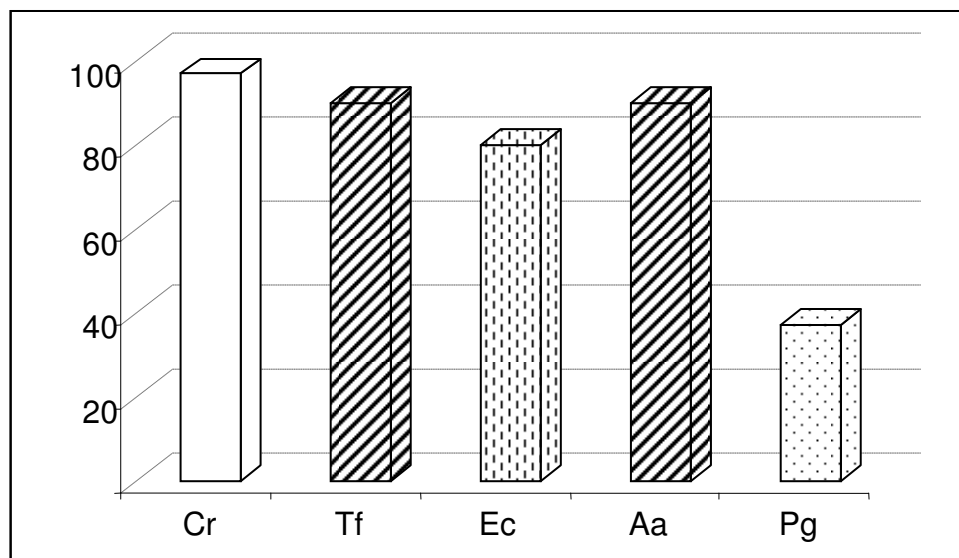
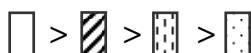


Figura 4 – Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados no presente estudo

Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ): Escala de diferença:



Foi realizada uma avaliação da prevalência dos periodontopatógenos em função do local da coleta (Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

*C. rectus* (Figura 5) e *A. actinomycetemcomitans* (Figura 8) apresentaram maior prevalência ( $p < 0,05$ ) na mucosa em comparação ao sulco e língua. Para *T. forsythia* (Figura 6), e *P. gingivalis* (Figura 9) a maior ( $p < 0,05$ ) prevalência foi observada no sulco. *E. corrodens* (Figura 7) a maior ( $p < 0,05$ ) prevalência foi observada no sulco e língua.

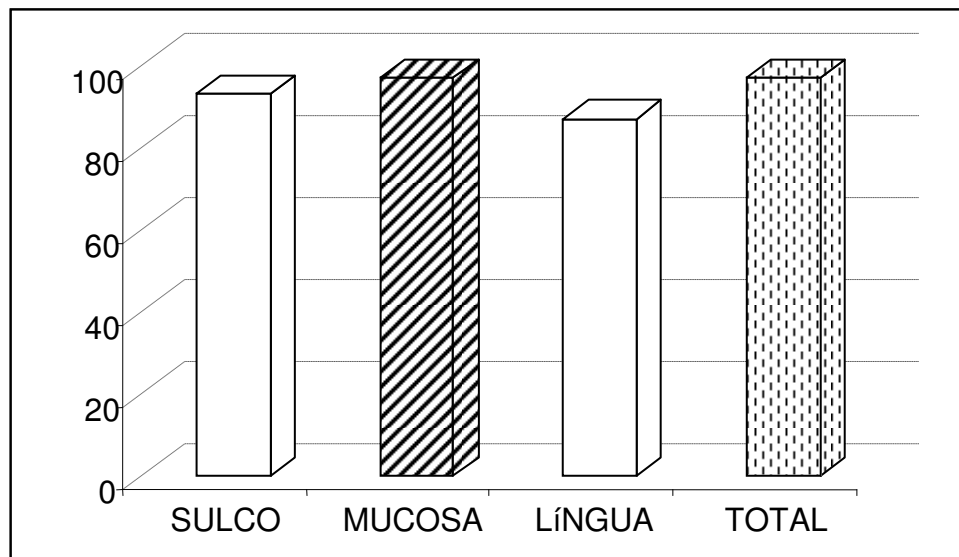




Figura 5 – Distribuição percentual da prevalência de *C. rectus* em função do local da coleta língua

Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ): Escala de diferença:  > 

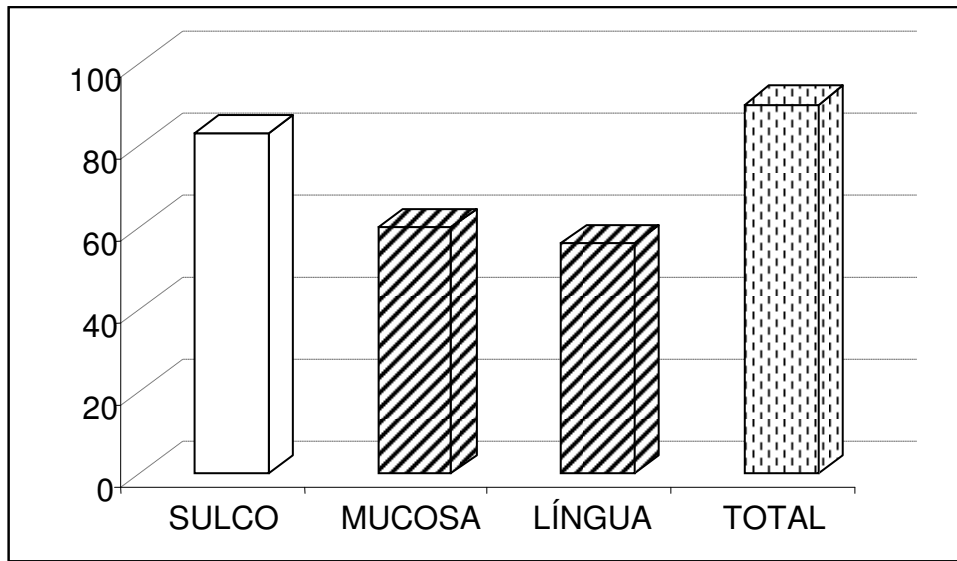


Figura 6 – Distribuição percentual da prevalência de *T. forsythia* em função do local da coleta

Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ): Escala de diferença:  $\square > \text{hatched}$

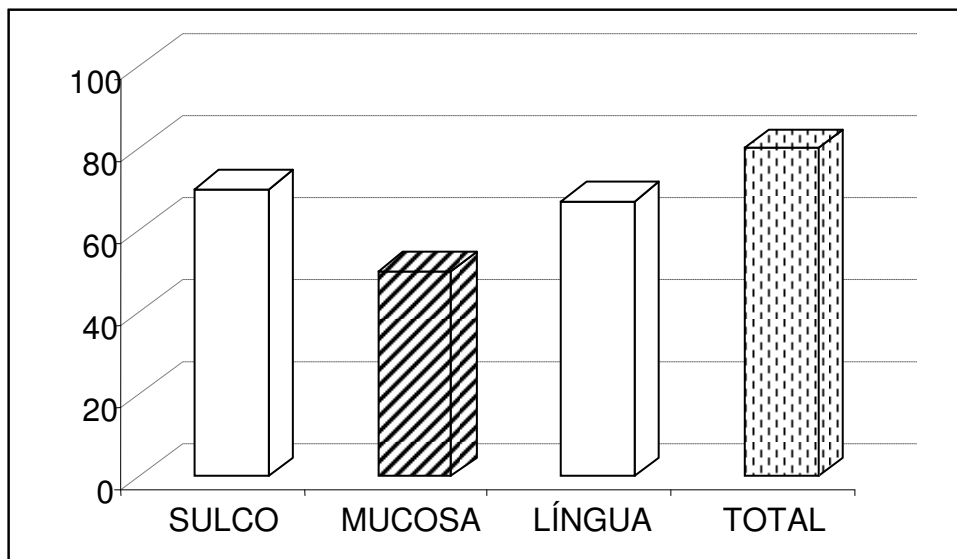


Figura 7 – Distribuição percentual da prevalência de *E. corrodens* em função do local da coleta

Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ): Escala de diferença:  $\square > \text{hatched}$

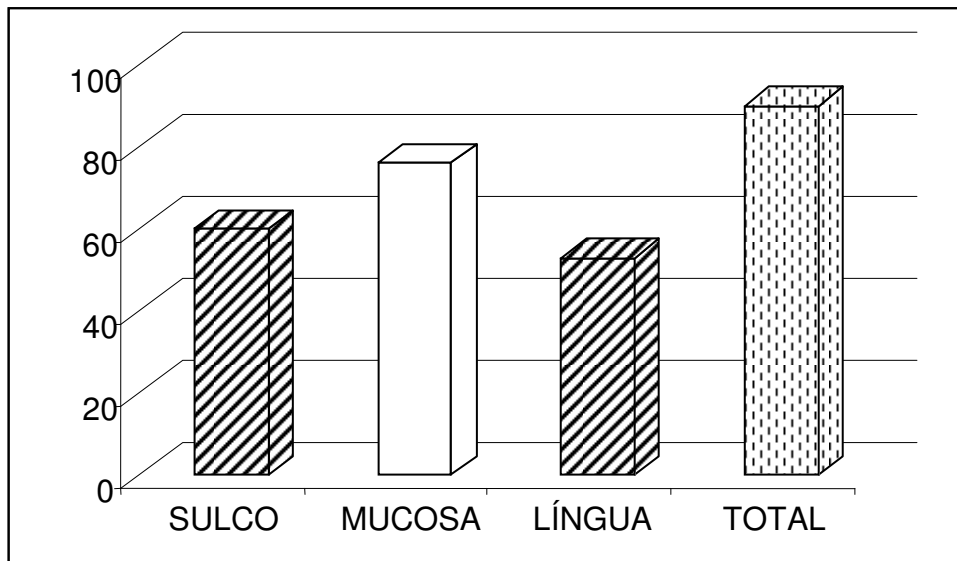




Figura 8 – Distribuição percentual da prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em função do local da coleta

Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ): Escala de diferença:  > 

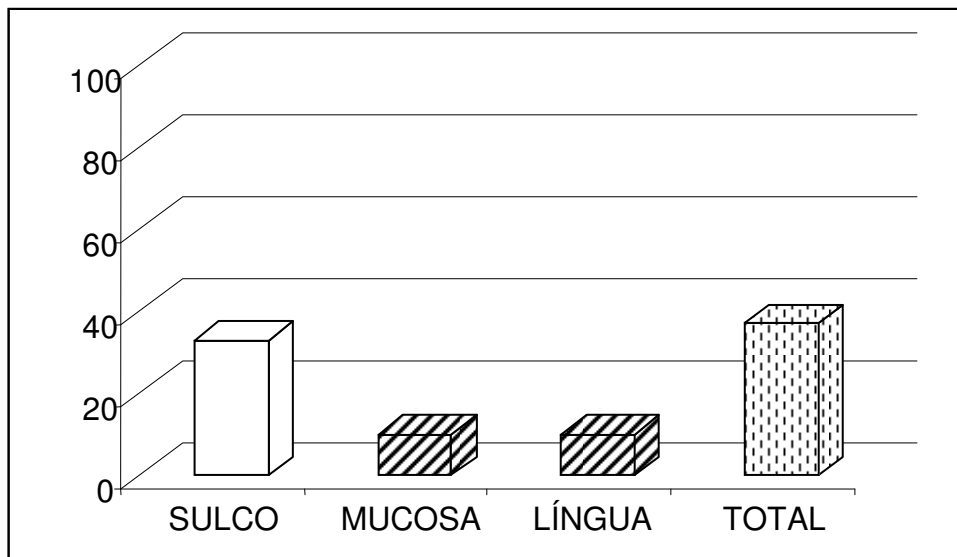




Figura 9 – Distribuição percentual da prevalência de *P. gingivalis* em função do local da coleta

Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ): Escala de diferença:  > 

Foi realizada também uma avaliação da prevalência de detecção, independente do patógeno, em função do local da coleta. Foi observada maior prevalência ( $p < 0,05$ ) de detecção no sulco em comparação com a mucosa e língua (Figura 10)

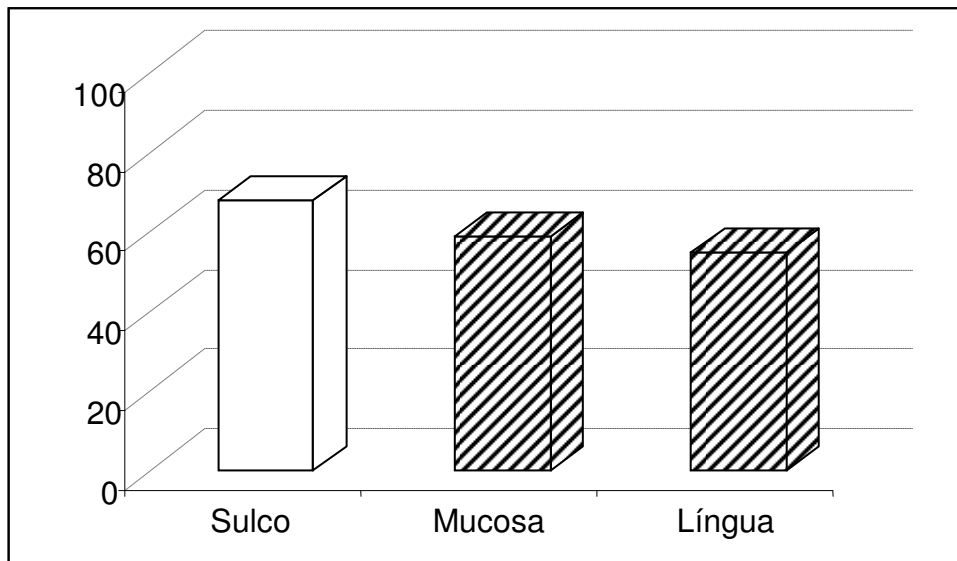


Figura 10 – Distribuição percentual da detecção dos periodontopatógenos no sulco, mucosa e língua.

Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ): Escala de diferença:  $\square > \text{hatched}$

Quando se avaliou o número de periodontopatógenos simultâneos por indivíduo, observou-se que a ocorrência de quatro periodontopatógenos concomitantes foi a associação mais freqüente, ( $p < 0,05$ ) seguido por cinco patógenos, e posteriormente por três, dois, zero e um, periodontopatógenos (Figura 11).

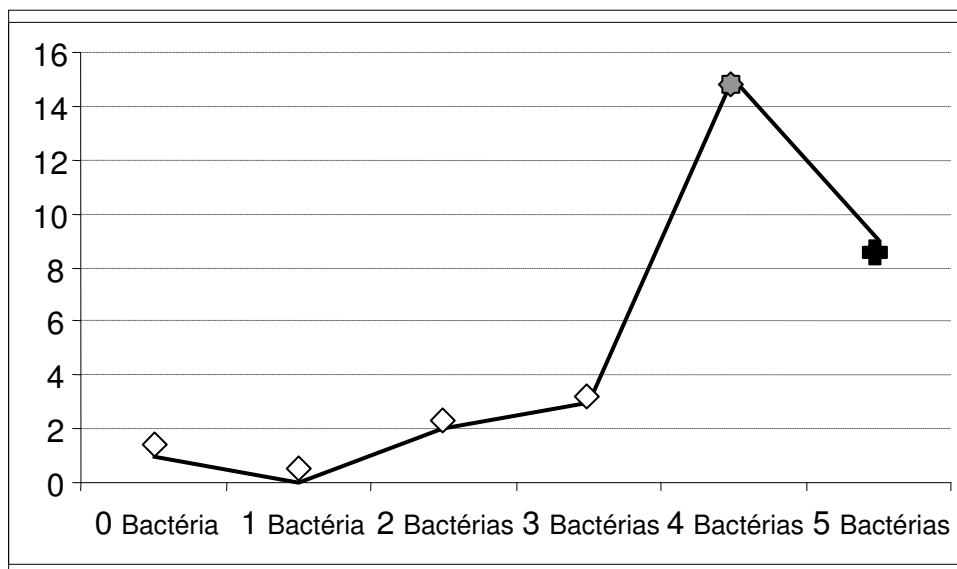


Figura 11 – Distribuição numérica da ocorrência simultânea de periodontopatógenos  
diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ): Escala de diferença:  $\text{star} > \text{plus} > \text{diamond}$

As prevalências dos periodontopatógenos foram ainda avaliadas em função do gênero (Figura 12) e hábito de fumar (Figura 13) não apresentaram ( $p < 0,05$ ) interferência na prevalência de nenhum dos periodontopatógenos avaliados. Porém, a faixa etária (Figura 14) interferiu ( $p < 0,05$ ) na prevalência de *P. gingivalis*, onde os indivíduos com idade acima de 37 anos apresentaram maior prevalência de *P. gingivalis*.

Para avaliação da interferência do grau de doença dos indivíduos na prevalência dos periodontopatógenos, os indivíduos foram divididos em dois grupos, em que o primeiro grupo foi composto pelos 15 indivíduos com as menores médias de NCI, caracterizando um grupo com média de NCI de 1,89mm. O segundo grupo, composto com os 15 indivíduos com as maiores médias de NCI, apresentou média de NCI de 3,35 mm. A comparação da prevalência dos periodontopatógenos entre os dois grupos mostrou maior prevalência ( $P < 0,05$ ) de *P. gingivalis* no grupo com maior média de NCI. Os demais patógenos não mostraram diferença estatisticamente significativa para essa avaliação (Figura 15).

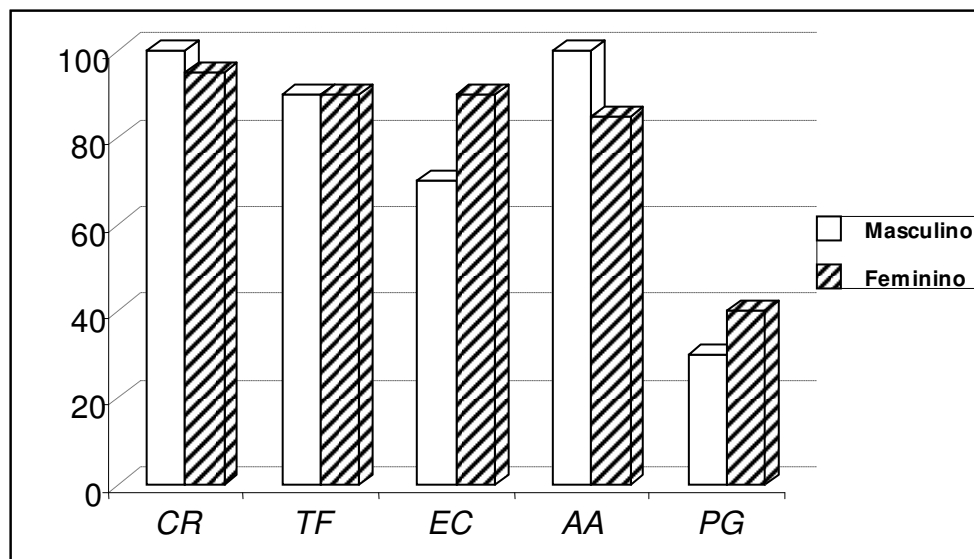


Figura 12 – Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados em função do gênero

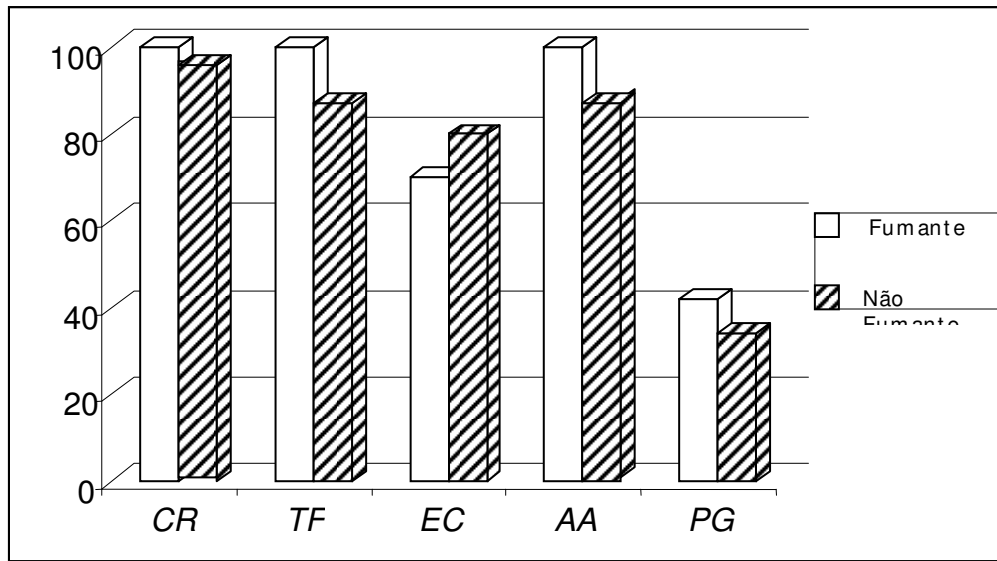


Figura 13 – Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados em função do hábito de fumar

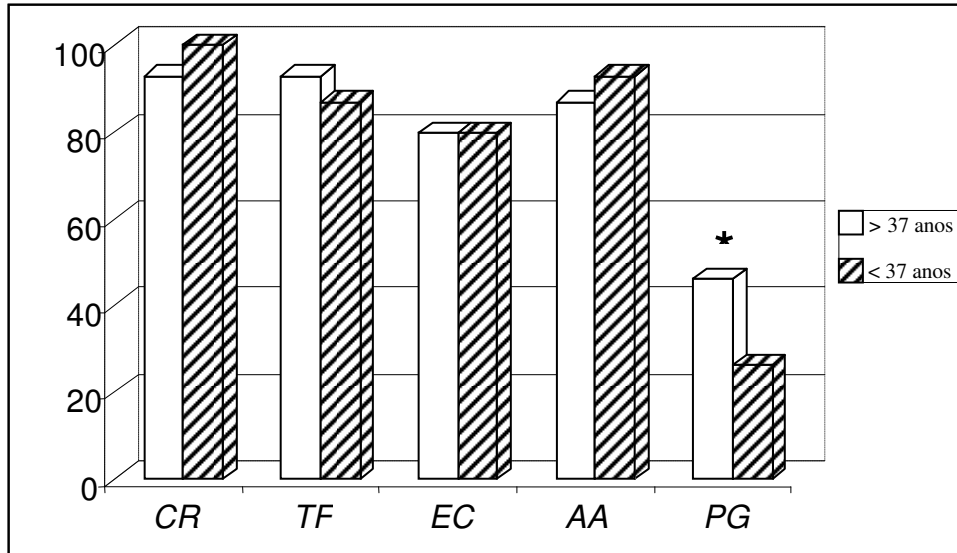


Figura 14 – Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados em função da faixa etária

\* - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )



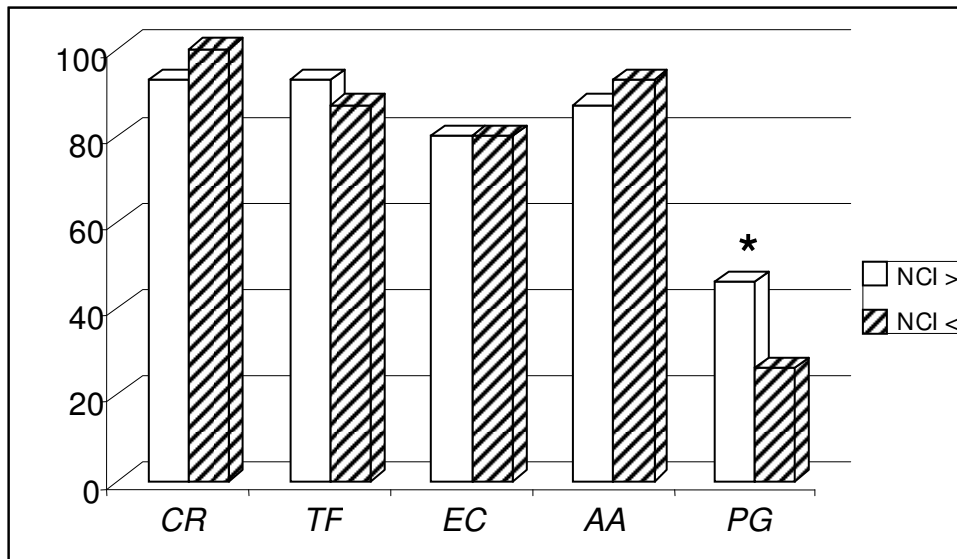


Figura 15 – Distribuição percentual da prevalência dos periodontopatógenos avaliados em função do nível do NCI

\* - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

## 6 Discussão

A avaliação da presença de periodontopatógenos numa população é justificada, pois, a obtenção destes dados associados a diferentes parâmetros clínicos periodontais incluindo presença de biofilme dental, índice gengival, mensuração de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, caracterizam o perfil periodontal destes indivíduos além das necessidades terapêuticas ideais para a manutenção de níveis adequados diretamente relacionados à saúde bucal e indiretamente à saúde geral. Outro aspecto relevante está na oportunidade de identificação destes microrganismos numa amostra de conveniência da população de Anápolis-GO. Sabendo-se que este estudo, inédito nesta região, contribuirá para a organização de políticas de atendimento em saúde bucal, mais especificamente de atenção a saúde periodontal junto as Secretarias de Saúde do município. E ainda, para a Associação Brasileira de Odontologia – ABO a identificação destes problemas contribuirá para uma melhor formação dos seus associados, cirurgiões dentistas, traduzindo num melhor atendimento populacional. E, finalmente para a Universidade de Taubaté significará, além de uma formação discente dentro dos melhores padrões de qualidade em pesquisa, uma contribuição significativa na divulgação do conhecimento em outras localidades do país.

Este estudo examinou indivíduos de uma amostra de conveniência dos habitantes da cidade de Anápolis-GO. As amostras foram compostas por jovens e adultos que procuraram ou foram indicados para tratamento clínico odontológico na Associação Brasileira de Odontologia de Anápolis – Go.

A cidade de Anápolis foi fundada em 1887, está a uma altitude de 1017 m e sua área total corresponde a 1078,2 km<sup>2</sup>. É cortada pelas rodovias BR-060, BR-153, BR-414, GO-222 e GO-330, o município está a 57 km de Goiânia, 160 de Brasília e 72 de Pirenópolis, numa posição estratégica para implantação de indústrias, visto a proximidade das capitais, federal e goiana. Sua população, segundo o IBGE (2004) está estimada em 307.977 habitantes. Sua principal atividade econômica é a indústria de transformação e comércio de mercadorias. Pratica-se no município a pecuária extensiva, com criação de gado de corte e leiteiro. A agricultura, que já foi a grande fonte de riqueza no passado, hoje é praticada em caráter de subsistência com cultivo de arroz, milho, feijão, café e mandioca, mas em função de sua localização privilegiada para o comércio do Centro-Oeste, ainda é o principal centro de comercialização de grãos do Estado. O Distrito Agroindustrial de Anápolis (DAIA), instalado em 9 de setembro de

1976, em uma área de 880 hectares, está localizado na mesoregião do centro Goiano, junto com o entorno de Brasília e Distrito Federal, representando um total aproximado de 4.500.000 habitantes, distribuídos por 84 municípios circunvizinhos. Trata-se da região mais desenvolvida do Centro-Oeste e com um dos mais expressivos potenciais de crescimento sócio-econômico apresentado nas últimas décadas, em todo o Brasil. Possui ramal da RFFSA que será acoplado à EADI – Estação Aduaneira do Interior (Porto Seco). A cidade é dotada de aeroporto Civil e sede da Base Aérea dos Supersônicos Mirage (IBGE 2005; CITY BRAZIL, 2005).

Para a obtenção dos dados clínicos optou-se por avaliar dados da condição gengival, expressados pelos índices de placa e gengival e, para avaliarmos as condições referentes ao estado periodontal propriamente dito utilizamos médias de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção. Por outro lado, optamos pela escolha da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar de forma qualitativa a presença dos periodontopatógenos aqui pesquisados.

O responsável pelo estudo foi previamente treinado e posteriormente calibrado tanto para obtenção dos dados clínicos quanto para a coleta microbiana, armazenamento e transporte das amostras. Este treinamento e calibração foram realizados na clínica de graduação da Faculdade de Odontologia de GURUPI-TO. O mesmo recebeu um treinamento específico em técnicas da reação em cadeia da polimerase no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Básico de Biociências da UNITAU, para o processamento das amostras no teste da PCR treinamento este que possibilitou a execução dos procedimentos laboratoriais desta técnica incluindo desde a extração do DNA, confirmação da extração e amplificação do DNA das amostras bacterianas coletadas e identificação das amostras por meio de visualização dos produtos amplificados por eletroforese.

O presente trabalho avaliou 30 indivíduos selecionados aleatoriamente de uma amostra original de 250 indivíduos conjuntamente examinados sob aspectos clínicos periodontais. No presente estudo adotou-se o critério aleatório estabelecendo-se como método a escolha de indivíduo para exame microbiano de sítios dentais, da mucosa e da língua para cada oito indivíduos avaliados clinicamente. Os dados microbianos obtidos foram então relacionados entre si (sítio dental; mucosa e língua), com os parâmetros clínicos periodontais (índices de placa e gengival, profundidade de sondagem, nível clínico de inserção) e finalmente com características individuais, gênero, faixa etária, hábito de fumar e higiene bucal.

A técnica de cultura bacteriana tem sido um método clássico para a identificação de microrganismos envolvidos na doença periodontal. Ressalta-se o fato de que esta técnica é vantajosa pelo fato de permitir a determinação de antibiogramas. Por outro lado, considera-se uma desvantagem da técnica o fato de se cultivar apenas alguns tipos de periodontopatógenos além de que estes microrganismos necessitam estar viáveis para seu crescimento em meio específico. Esta técnica mostra-se ainda dispendiosa e necessita-se de muito tempo para a sua operação. Já os ensaios enzimáticos representam uma técnica de rápida execução, pouco dispendiosa que detecta grupos bacterianos através de informações referentes aos perfis enzimáticos dos microrganismos, todavia esta técnica se limita apenas a poucos microrganismos associados à doença periodontal (CORTELLI *et al.* 2000).

Desde 1990, o teste da reação em cadeia da polimerase tem sido usado em larga escala e com grande sucesso na identificação de periodontopatógenos presentes no biofilme subgengival. Esta técnica baseia-se na análise dos ácidos nucléicos, sendo considerado o mais sensível dos testes microbiológicos. Nesta técnica selecionam-se dois *primers* numa região do DNA a ser amplificada. O DNA bacteriano desnaturado hibridiza-se com os *primers* que regulam a extensão do mesmo, originando seqüências de DNA idênticas ao segmento padrão (CORTELLI *et al.* 2000). Por causa da qualidade desta técnica e em função das condições de coleta, armazenamento e posterior processamento optou-se neste estudo, pela utilização da reação em cadeia da polimerase.

No presente estudo observou-se que, independente do local de coleta, no total de indivíduos avaliados, *C. rectus* apresentou a maior prevalência (97%) entre os periodontopatógenos pesquisados, seguido por *T. forsythia* (90%) e *A. actinomycetemcomitans* (90%), *E. corrodens* (80%) e finalmente *P. gingivalis* (37%) (Figura 1). Nos estudos de Slots, Ashimoto e Flynn, (1995) *T. forsythia* apresentou a maior prevalência (91,4%), entre os periodontopatógenos pesquisados, seguido por *C. rectus* a prevalência de (66%) e *E. corrodens* (66,3%), *P. gingivalis* (63,4%) e *A. actinomycetemcomitans* (52,8%), diferentes dos nossos achados. Já os estudos de Colombo *et al.* em 2002, estudando amostras de biofilme subgengival com técnica de *checkerboard DNA-DNA hybridization* de indivíduos com doença periodontal e saudáveis encontraram uma prevalência de *P. gingivalis* (58% e 20%), *C. rectus* (52% e 28%), *T. forsythia* (56% e 10%), *E. corrodens* (52% e 38%) e *A. actinomycetemcomitans* (41% e 25%) respectivamente. Já Ávila-Campos e Velásques-

Melendez em 2002 estudando biofilme subgingival usando as técnicas de cultura e PCR com indivíduos com saúde e doença periodontal, encontraram uma prevalência com PCR de *A. actinomycetemcomitans* (70% e 90%), *P. gingivalis* (66% e 78%), *T. forsythia* (30% e 82%), *E. corrodens* (50% e 80%), *C. rectus* (48% e 80%) respectivamente. Enquanto Fujise *et al.* em 2002, estudando biofilme subgingival usando a técnica de PCR constataram 8,7% para *T. forsythia* em indivíduos com doença periodontal e saudáveis 30% e uma frequência alta para a combinação de *P. gingivalis* e *T. forsythia* 32,4% (saudáveis) e 74% (doença periodontal). Diferenças entre estes estudos podem ser devido à população estudada e tipo de técnica utilizada.

Klein e Gonçalves (2003) avaliaram a prevalência de *T. forsythia* e *P. gingivalis* em amostra de biofilme subgingival utilizando PCR. Prevalência de 70% para *T. forsythia* e 40% para *P. gingivalis* em indivíduos com periodontite com profundidade de bolsas  $\leq$  a 5mm. Os resultados indicaram uma possível associação entre doença periodontal e *T. forsythia* e/ou *P. gingivalis*. Já em nossos estudos encontramos uma grande quantidade de bactérias no sulco, mucosa e língua, sendo a *P. gingivalis*, com menos prevalência, mas estatisticamente significativa para a doença periodontal.

*C. rectus* (Figura 5) e *A. actinomycetemcomitans* (Figura 8) apresentaram maior prevalência na mucosa em comparação ao sulco e à língua. Para *T. forsythia* (Figura 6), e *P. gingivalis* (Figura 9) a maior prevalência foi observada no sulco. Para *E. corrodens* (Figura 7) a maior prevalência foi observada no sulco e língua.

Podemos observar, na Figura 5, uma diferença estatisticamente significativa para *C. rectus* que esteve mais presente na mucosa que no sulco e língua. Isto significa que o sítio de colonização preferencial deste patógeno não foi o intra-sulcular, assim, se estudos avaliarem a presença de *C. rectus* apenas no sulco estes dados subestimaram sua real prevalência bucal.

Podemos observar, na Figura 6, uma diferença estatisticamente significativa para *T. forsythia* que está mais presente no sulco que na língua e mucosa. Então quando for necessário coletar amostras para pesquisar esta bactéria pode-se fazê-la somente do sulco gengival, onde ela está mais presente segundo nossos achados.

Observamos na Figura 7, que a bactéria *E. corrodens* está mais presente no sulco e língua que na mucosa — uma diferença estatisticamente significativa — indicando que amostras para pesquisa desta bactéria poderiam ser coletadas tanto da região do sulco gengival quanto da língua, pois neste estudo ela foi encontrada em maior quantidade nestas duas regiões.

Encontramos, na Figura 8, uma diferença estatisticamente significativa que a bactéria *A. actinomycetemcomitans* está mais presente na mucosa que na língua e sulco. Para pesquisar o *A. actinomycetemcomitans* pode-se coletar amostra somente da mucosa, onde foi encontrado com mais frequência neste estudo.

Podemos observar, na Figura 9, que a bactéria *P. gingivalis* está mais presente no sulco que na mucosa e língua — uma diferença estatisticamente significativa. Para estudar a bactéria *P. gingivalis*, as amostras deverão ser coletadas do sulco gengival, onde foi mais presente neste estudo

Neste estudo foi realizada também uma avaliação da prevalência de detecção, independente do patógeno, em função do local da coleta. Foi observada maior prevalência de detecção no sulco em comparação com a mucosa e língua (Figura 10).

Na população de adultos jovens de Anápolis, quando se avaliou o número de periodontopatógenos simultâneos por indivíduo constatou-se uma maior frequência de 4 periodontopatógenos, seguido por 5 patógenos, e posteriormente por três, dois, zero e um periodontopatógenos (Figura 11). Isto significa que na população estudada, quando o indivíduo mostrou-se positivo para os microrganismos, estes estiveram sinergicamente presentes o que potencializaria sua ação de degradação tecidual levando a uma maior possibilidade de destruição periodontal. Assim, a detecção de um grande número de bactérias nos indivíduos participantes deste estudo indica um risco para desenvolver a doença periodontal no futuro. Por isto medidas terapêuticas devem ser tomadas para a manutenção da saúde periodontal, por parte da Secretaria de Saúde do Município ou pelas entidades relacionadas com a saúde bucal, mais especificamente com atenção a saúde periodontal.

Os parâmetros periodontais (presença de biofilme dental, índice gengival, avaliação de profundidade de bolsa e nível clínico de inserção) não foram concordantes com os números de bactérias encontradas, significando que, apesar da detecção microbiana, os parâmetros aqui utilizados falharam nesta associação. Todavia, vale aqui ressaltar que parâmetros clínicos periodontais refletem uma condição de sinais clínicos da doença, enquanto os parâmetros microbianos podem antecipar-se aos sinais clínicos mostrando um perfil microbiano ainda numa fase considerada subclínica da doença.

A prevalência dos periodontopatógenos foi ainda avaliada em função do gênero (Figura 12), hábito de fumar (Figura 13), faixa etária (Figura 14) e nível clínico de inserção NCI dos indivíduos (Figura 15).

Gênero (Figura 12) e hábito de fumar (Figura 13) não apresentaram interferência na prevalência de nenhum dos periodontopatógenos avaliados. Porém, a faixa etária (Figura 14) interferiu na prevalência de *P. gingivalis*, em que os indivíduos com idade acima de 37 anos apresentaram maior prevalência de *P. gingivalis*. Portanto ter mais idade significou risco maior para a presença de *P. gingivalis*. Concordando com os nossos resultados estão vários autores onde associaram microrganismos específicos com locais de perda de inserção clínica e com o aumento da idade. A prevalência, gravidade da periodontite e perda do nível de inserção estavam diretamente proporcionais à idade (FLORES-DE-JACOBY *et al.* 1991; LISTGARTEN, LAI E YOUNG,1993; OPPERMANN; SILVA; BASSANI, 2000; ALBANDAR, 2002; SUSIN *et al.* 2004).

Socransky *et al.* (1988), Zambom (1996) e Gmür, Strub e Guggenheim em 1989 concluíram que perda do nível de inserção aumenta chances de detectar *P. gingivalis* e *T. forsythia*.

Para associação entre o nível clínico de inserção, que reflete a história pregressa da doença e a prevalência dos periodontopatógenos, os indivíduos foram divididos em dois grupos. O primeiro foi composto pelos 15 indivíduos com menores médias (1,89mm) de perda de inserção clínica. O segundo grupo, composto por 15 indivíduos com as maiores médias (3,35mm) de perda de inserção clínica. A comparação da prevalência dos patógenos periodontais entre os dois grupos mostrou maior prevalência de *P. gingivalis* no grupo com maior média de perda de inserção clínica. Os demais patógenos não mostraram diferença estatisticamente significativa para essa avaliação (Figura 15). Discordantes deste estudo estão Takamatsu *et al.*, (1999) em que a bactéria mais prevalente foi *T. forsythia* usando a técnica do PCR. Avila-Campos; Velásques-Meléndez (2002) encontraram uma prevalência de *P. gingivalis* de 66% em indivíduos saudáveis e 78% em indivíduos com doença periodontal, e uma prevalência de 30% e 90% respectivamente para *T. forsythia*. Fujise *et al.*, (2002) encontraram maior prevalência de *A. actinomycetemcomitans*. Klein e Gonçalves (2003) encontraram mais prevalência de *T. forsythia* (100%) que de *P. gingivalis* (90%) em indivíduos com bolsas maiores que cinco mm. Estes dados prevalentes encontrados diferiram daqueles obtidos na nossa população, mostrando que o perfil microbiano populacional difere de acordo com a população alvo e metodologia empregada.

Colombo *et al.* (2002) encontraram prevalência de bactérias em pacientes com doença periodontal e saúde periodontal para *P. gingivalis* 58% e menos que 20% , para *C. rectus* 52% e 28%, para *T. forsythia* 56% e 10%, para *E. corrodens* 52% e 38% e

para *A. actinomycetemcomitans* 40% e 22% respectivamente. E de todas as bactérias pesquisadas, um pequeno número fortemente relacionado com sinais clínicos de doença periodontal *T. forsythia* e *P. gingivalis*.



## 7 Conclusões

De acordo com os seguintes resultados

- ✓ Ausência de associação entre parâmetros clínicos e gênero.
- ✓ Maior PIC em relação ao fator idade e hábito de fumar.
- ✓ Prevalência bacteriana *C. rectus* (97%), *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* (90%) *E. corrodens* (80%), e *P. gingivalis* (37%).
- ✓ Maior prevalência de *C. rectus* e *A. actinomycetemcomitans* na mucosa em relação ao sulco e língua,
- ✓ Maior prevalência de *E. corrodens* *T. forsythia* e *P. gingivalis* no sulco.
- ✓ Maior prevalência de *E. corrodens* na língua que na mucosa.
- ✓ *P.gingivalis* mais prevalente em relação ao fator idade e PIC.

Podemos concluir que o número de bactérias presentes foi elevado existindo associação entre *P. gingivalis* com o fator idade e perda de inserção clínica. Não houve distribuição uniforme entre os patógenos e o local da coleta.

## Referências

ADDY, M. et al. An 8 years study of changes in oral hygiene and periodontal health during adolescence. **Int J Paediatr dent**, v. 4, n. 2, p. 75, June 1994.

ALBANDAR, J. M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 29, p. 177-206, 2002.

ALPAGOT, T. Risk indicators for periodontal disease in a racially diverse urban population. **J Clin Periodontol**, v. 23, n. 11, p. 982-988, Nov. 1996.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Consensus report on periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. **Annals of Periodontology**, v. 67, p. 926–932, 1996.

ARAUJO, M. W. B. et al. Reproducibility of probing depth measurements using a constant force electronic probe: analysis of inter- and intra-examiner variability. **J Periodontol**, v. 74, n. 12, p. 18-22, Dec. 2003.

ARAUJO, M. W. B.; CORTELLI, S. C. Metodologia de pesquisa aplicada à periodontia médica. In: BRUNETTI, M. C. **Periodontia médica**. Uma abordagem integrada. São Paulo: Senac, 2004.

ARBES JR, S. J.; BECK, J. D. Epidemiologia das doenças gengivais e periodontais. In: NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.H.; CARRANZA, F.A. **Periodontia Clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 5, p. 66-83.

ASHIMOTO, A. et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v. 11, n. 4, p. 266-273, Aug. 1996.

ÁVILA-CAMPOS, M. J.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev Inst Trop S Paulo**, v. 44, n. 1, p. 1-5, jan.-fev. 2002.

BOUTAGA, K. et al. Comparison of real-time pcr and culture for detection of Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque samples. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 4950-4954, Nov. 2003.

CITY BRAZIL. **Cidades**. Disponível em: <<http://www.citybrazil.com.br/go/anapolis/>> Acesso em: 14 nov. 2005.

COLOMBO, A. P. V. et al. Subgingival microbiota of brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 73, n. 4, p. 360-369, Apr. 2002.

CORTELLI, J. R. et al. Métodos para detecção de periodontopatógenos. **PGR: Pós-grad. Rev. Fac. Odontol**. São José dos Campos, v. 3, n. 1, jan./jun., 2000.

CORTELLI, J. R. et al. Prevalence of periodontal pathogens in brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 8, p. 860-866, Aug. 2005.

COSTERTON, J. W. et al. Biofilmes, the customized microniche. **J Bacteriol**, v. 176, n. 8, p. 2137-2142, Apr. 1994.

DARVEAU, R. P.; TANNER A. C. R.; PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 12–32, 1997.

DZINK, J. et al. Gram-negative species associated with active destruction periodontal lesions. **J Clin Periodontol**, v. 12, n. 8, p. 648-659, Sept. 1985.

DZINK, J.; SOCRANSKY, S.; HAFFAJEE, A. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v. 15, n. 5, p. 316–323, May 1988.

FLORES-DE-JACOBY, L. et al. Periodontal conditions in Rio de Janeiro City (Brazil) using the CPITN. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 19, n. 2, p. 127-128, Apr. 1991.

FUJISE, O. et al. Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. **J Periodontol**, v. 73, n. 11, p. 1253-1259, Nov. 2002.

GEMMELL, E.; MARSHALL R. I.; SEYMOUR G. J. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 112–143, 1997.

GENCO, R. J. Microbiota Dental Microbiana. In: GENCO, R. J. **Periodontia Contemporânea**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1997.

GMÜR, R.; STRUB, J. R.; GUGGENHEIM, B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. **J Period Res**, v. 24, n. 2, p. 113-120, Mar. 1989.

GREENBERG, R. S. **Medical epidemiology**. 2. ed. Norwalk, C. T., Appleton & Lange, 1996.

HAAKE, S. K; HUANG, G. T. J. Biologia molecular da interação hospedeiro-micróbio nas doenças periodontais: Tópicos selecionados. In: CARRANZA, F. A. **Periodontia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 9, p. 137-149.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 5, p. 78-111, 1994.

HAMADA, S., et al. Selection induction of prostaglandin E production in C3H/HeJ mouse macrophages by lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis*.. **Oral Microbiol Immunol**, v. 3, n. 4, p. 196-198, Dec. 1988.

HELGELAND, K.; NORDBY O. Cell cycle-specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Periodont Res**, v. 28, n. 3, p. 161-165, May 1993.

HIDALGO, M. M.; AVILA-CAMPOS, M. J.; TREVISAN Jr., W. et al. Neutrophil chemotaxis and serum factor modulation in Brazilian periodontitis patients. **Arch Med Res**, v. 28, n. 4, p. 531-535, 1997.

IBGE. **Cidades@**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/default.php> > Acesso em: 20 out. 2005.

ISHIKURA, H. Cloning of the *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) *siaHI* gene and purification of the sialidase enzyme. **J Med Microbiol**, v. 52, n. 12, p. 1101-1107, Dec. 2003.

JOHNSON, S. M, PANKEY, G. A. Eikenella corrodens osteomyelitis, arthritis, and cellulitis of the hand. **South Med J**, v. 69, n. 5, p. 535-539, May 1976.

KINANE, D. F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 25, p. 8–20, 2001.

KINANE, D. F.; LINDHE, J.; M. Periodontite Cronica. In: LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 8, p. 205-211.

KLEIN, M. I.; GONÇALVES, R. B. Detection of Tannerella forsythensis and Pophyromonas gingivalis by polymerase chain reaction in subjects with periodontal status. **J Periodontol**, v. 74, n. 6, p. 798-802, June 2003.

LISTGARTEN, M. A.; LAI, C. H.; YOUNG, V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. **J Periodontol**, v. 64, n. 3, p. 155–161, Mar. 1993.

LOCKER, D.; SLADE, G. D.; MURRAY, H. Epidemiology of periodontal disease among older adults: a review. **Periodontol 2000**, v. 16, p. 16-33. 1998.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEM B. Experimental gingivitis in man. **J Periodontol**, v. 36, p. 177-187, May/June 1965.

LOESCHE, W. J. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics.

**J Periodontol**, v. 63, p. 1102- 1109, Dec. 1992.

LOPEZ, N. J.; MELHADO, J. C.; LEIGHTON, G. X. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 23, n. 2, p. 101-105, Feb. 1996.

LOPEZ, N. J. et al. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. **J Periodontol**, v. 75, n. 5, p. 717-725, May 2004.

LOOMER, P. M. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 34, p. 49-56, 2004.

LOTUFO, R. F. M.; PANNUTI, C. M.; SARAIVA, M. C. *Bacteroides forsythus*: sensibilidade a antimicrobianos em amostras de pacientes portadores de periodontite. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 1, p. 47-50, jan./mar. 2001.

MACHION, E. et al. A influência do sexo e da idade na prevalência de bolsa periodontais. **Pesq Odont Bras**, v. 14, n. 1, p. 33-37, jan/mar. 2000.

MACHTEI, E. E. et al. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. **J Clin Periodontol**, v. 26, n. 6, p. 374- 380. June 1999.

MARIOTTI, A. Dental plaque-induced gingival diseases. Review. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 7-19, Dec. 1999.

MATSUDA, N. et al. *Porphyromonas gingivalis* reduces mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to platelet-derived growth factor in vitro. **J Periodontol**, v. 67, n. 12, p. 1335 – 1341, Dec. 1996.

MEDRONHO, R. A. Epidemiologia, parte II. In: BLOCH, K. V.; COUTINHO, E. S. F. **Fundamentos da pesquisa epidemiológica**. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 7, p. 107-113.

- MILLAR, S. J. et al. Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteroides gingivalis*. **Infect Immun**, v. 51, n. 1, p. 302-306, Jan. 1986.
- MOORE, W. E. C. et al. Comparative microbiology of juvenile periodontitis. **Infect Immunol**, v. 48, n. 2, p. 507-519, May 1985.
- NAGY, R. J.; NOVAK, M. J. Periodontite Crônica. In: NEWMAN, M.G.; TAKEI, H. H.; CARRANSA, F.A. **Periodontia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 26, p. 354-362.
- NCBI. **PUBMED**. Banco de Dados. Disponível em <<http://www.pubmed.org>> Acesso em: 17 jan. 2006
- NOVAK, M. J. Classificação das Doenças e Condições que Afetam o Periodonto. In: NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; CARRANSA, F.A. **Periodontia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 4, p. 58-65.
- OPPERMANN, R. V.; SILVA, C. M.; BASSANI, D. G. Prevalência e severidade da periodontite em uma população gaúcha adulta. **Pesqui Odontol Bras**, v. 14, p. 100, abr./jun. 2000.
- PASTER, B. J. et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacteriol**, v. 12, p. 3770-3783, June 2001.
- RIGGIO, M.P. et al. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J Periodontal Res**, v. 31, n. 7, p. 496-501, Oct. 1996.
- RODENBURG, J. P., et al. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. **J Clin Periodontol**, v. 17, n. 6, p. 392-399, July 1990.

SAKAMOTO, M. et al. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (TANNER *et al.* 1986) as *Tannerella forsythensis*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, p. 841-849, May 2002.

SANZ, M. et al. 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, n. 12, p. 1034-1047, Dec. 2004.

SAVITT, E. D. et al. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. **J Periodontol**, v. 59, n. 7, p. 431-438, July 1988.

SLOTS, J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. **Oral Microbiol Immunol**, v. 1, n. 1, p. 48-55, Nov. 1986.

SLOTS, J.; ASHIMOTO, A.; FLYNN, M. J. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin Infect Dis**, v. 20, p. 304-307, June 1995.

SLOTS, J. A. *actinomycetemcomitans* In: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. **Microbiologia oral e imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 17, p. 187-191, 1997.

SOCRANSKY S. S. et al. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. **J Clin Periodontol**, v. 14, n. 10, p. 588-593, Nov. 1987.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 2, p. 134-144, Feb. 1988.



SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Evidence of bacterial etiology: A historical perspective. **Periodontol** 2000, v. 5, p. 7-25, June 1994.

SOCARANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Microbiologia do periodonto. In: LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 4, p. 105-147.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol** 2000, v. 28, p. 12-55, 2002.

SUSIN, C. et al. Periodontal attachment loss in an urban population of brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **J Periodontol**. v. 75, n. 7, p. 1033-1041, July 2004.

TAKADA H. et al. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with Bacteroides lipopolysaccharides. **Infect Immun**, v. 59, v. 1, p. 295-301, Jan. 1991.

TAKAMATSU, N. et al. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis, and Actinobacillus actinomycetemcomitans. **J Periodontol**, v. 70, n. 6, p. 574-580, June 1999.

TAKEUCHI, Y. et al. Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 72, n. 10, p. 1354-1363, Oct. 2001.

TEMPRO, P. J. et al. In: Nisengard, R J, Newman, MG. **Microbiologia oral e imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, cap. 18, p. 193-196.

TRAN, S. D. et al. Persistent presence of Bacteroides forsythus as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. **J Periodontol**, v. 72, n. 1, p. 1-10, Jan. 2001.

VAN DYKE, T.E. et al. Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. **J Periodontol**, v. 53, n. 8, p. 502-508, Aug. 1982.

VAN WINKELHOFF, A. J. et al. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction **J Clin Periodontol**, v.29, n.11, p.1023-1028, Nov. 2002.

WATANABE, K.; FROMMEL, T. O. Detection of Porphyromonas gingivalis in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. **J Dent Res**, v. 72, n. 3, p. 1040-1044, Mar. 1993.

YOSHIMURA F. et al. Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe Bacteroides gingivalis. **J Bacteriol**, v. 160, n.3, p. 949-957, 1984.

YUAN, K. et al. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. **J Periodontal Res**, v. 36, n. 1, p. 18-24, Feb. 2001.

ZAMBON, J. J. Periodontal disease: Microbial factors. **Ann Periodontol**, v. 1, n.1, p. 879-925, Nov. 1996.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A - Esclarecimento aos pacientes

#### **Esclarecimento aos participantes da pesquisa**

Neste estudo iremos pesquisar bactérias dentro da gengiva, para isto, iremos colocar cones de papel dentro da gengiva e esperar por um minuto e passaremos um cotonetes na língua e bochecha. Depois vamos pesquisar quais bactéria estariam presentes tanto na gengiva quanto na língua e bochecha e com isso iremos verificar quais bactérias estariam provocando a doença periodontal.

A doença periodontal é uma inflamação da gengiva causada por bactérias, que quando não tratada pode evoluir e provocar a perda de osso em volta dos dentes deixando-os moles necessitando de extraí-los.

Cada participante será identificado por número, assim a sua identidade será preservada.

Agradeço sua participação.

Paulo César Tavares – Pesquisador

## **APÊNDICE B**– Termo de consentimento para indivíduos em estudos experimentais

Título: Avaliação de periodontopatógenos em amostra de conveniência de jovens adultos da cidade de Anápolis – Go.

Pesquisador principal: Paulo César Tavares

Descrição: Estou ciente de que os exames microbiológicos colhidos serão usados para pesquisar a presença de 5 bactérias considerados causadores da doença periodontal. O objetivo deste estudo será de avaliar a presença de bactérias (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campilobacter rectus*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Eikenella corrodens*). Este estudo promoverá o conhecimento das bactérias que causam a doença periodontal bem como o perfil periodontal dos indivíduos participantes e as necessidades terapêuticas para promoção da saúde.

Tempo envolvido e benefício: estou ciente que nenhum tempo adicional me será requisitado por eu participar de tal estudo.

Outras informações:

\*\*\*\*Os indivíduos incluídos neste estudo responderão a um questionário de anamnese (história médico-odontológica, hábitos, comportamentos e características demográficas) e após este procedimento serão submetidos a exames odontológicos, feito por um examinador (Cirurgião Dentista responsável pelo estudo). Os indivíduos serão encaminhados para tratamento odontológico de que necessitam (periodontia, dentística restauradora, endodontia, patologia oral, implantodontia, cirurgia buco-maxilo, prótese dental, ortodontia). Participação é inteiramente voluntária e você poderá retirar-se da participação a qualquer hora, sem afetar, de maneira alguma, o curso de seu tratamento. Sua identidade será mantida confidencial. Responderemos a quaisquer perguntas que você possa ter.

Custo e pagamentos:

\*\*\*\*As necessidades de cada indivíduo serão cobradas pela ABO-GO de Anápolis por cada procedimento realizado desde que queira fazer o tratamento.

Sigilo: estou ciente de que qualquer informação a meu respeito obtida na pesquisa será confidencial. Estou ciente de que os dados da pesquisa, podem ser intimados com mandato judicial. Foi me explicado que minha identidade não será revelada em qualquer descrição ou publicação desta pesquisa.

Direito de se retirar da pesquisa: estou ciente de que posso me recusar a participar neste estudo e que a minha decisão não afetará negativamente o atendimento a ser recebido por esta instituição ou causar perda de benefícios aos quais, de outra forma, teria direito.

Indenização e danos: estou ciente de que no caso de danos físicos ou doença resultantes deste procedimento não haverá indenização em dinheiro, mas qualquer emergência que possa ser necessário me serão dados. Eu posso chamar o pesquisador para obter informações sobre o tratamento se isto for necessário.

Consentimento voluntário: Eu certifico que li o acima exposto ou que o mesmo tenha sido lido para mim e compreendo o seu conteúdo. Quaisquer dúvidas que eu tenha pertinentes a pesquisa serão respondidas por um dos pesquisadores mencionados acima.

Quaisquer perguntas que eu tenha com relação a meus direitos como indivíduo pesquisado, serão respondidas. Uma cópia deste documento me será entregue. Minha assinatura abaixo significa que eu concordei em participar nesse estudo experimental.

Data \_\_ / \_\_ / \_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Testemunha

Eu declaro que expliquei ao acima mencionado a natureza e finalidade , benefícios potenciais e possíveis riscos associados à participação neste estudo. Eu respondi a todas as perguntas que me foram feitas e testemunhei a assinaturas acima.

Data- \_\_ / \_\_ / \_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Para menores de idade. Eu \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ também li o acima  
exposto e concordo a participação de meu filho(a).

Data \_\_ / \_\_ / \_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
testemunha

**APÊNDICE C – Ficha de anamnese**

Número do Prontuário:

Data do exame: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome:

Centro:

Gênero:  feminino  masculino

Cor:  Branca  Preta  Pardo  Indígena  Amarelo

Idade (em anos):

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Estado civil:  solteiro(a)  casado(a)  viúvo(a)  separado(a)

divorciado(a)  vive com parceiro(a)

Naturalidade (estado aonde

nasceu): \_\_\_\_\_

Local de residência:  zona urbana  zona rural

Local de trabalho:  zona urbana  zona rural  não trabalha

Bairro: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_

Estado: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Educação:  Primeiro grau incompleto  Primeiro grau completo  Segundo grau incompleto

Segundo grau completo  Superior incompleto  Superior completo

Pós- graduação

Emprego atual:  Trabalhador(a) com carteira assinada  Trabalhador(a) sem carteira assinada

Trabalhador(a) autônomo ou dona de casa  Estudante

Desempregado

Aposentado(a)  outro \_\_\_\_\_

Renda familiar:  Menos que 1 salário mínimo  1 a 5 salários mínimos

5 a 10 salários-mínimos  > 10 salários-mínimos

**HISTÓRIA ODONTOLÓGICA**

Visita regularmente o dentista?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Frequência	_____		
Data da última visita	_____		
Está satisfeito(a) com a saúde bucal em geral?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Está satisfeito com a aparência dos seus dentes?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Acha que seus dentes estão afetando a sua saúde de alguma forma?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Tem problemas de alimentação devido a problemas dentários?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Sofre de sinusite?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Respira pela boca?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Ouve ou sente algum ruído quando mastiga?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Sente dor em alguma parte da boca ou dente quando mastiga?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Algum dente dói com o frio, calor ou doce?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Quando come fica com alimento preso entre os dentes?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Tem dentes abalados (moles)?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Algum dente mudou de lugar?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Sente gosto desagradável na boca?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Sente a gengiva irritada, inchada ou dolorida?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Sua gengiva sangra frequentemente?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Escova os dentes com regularidade?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Quantas vezes por dia?	_____		
Tipo de escova?	<input type="checkbox"/> Macia	<input type="checkbox"/> Média	<input type="checkbox"/> Dura
Usa fio ou fita dental?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Frequência:	_____		
Faz bochecho com anti-séptico?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Já fez ou faz uso de flúor?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Frequência	_____		
Já fez tratamento periodontal?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei

Há quanto tempo?	_____		
Já fez cirurgia periodontal (“cirurgia de gengiva”)?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Já fez tratamento endodôntico (canal) anteriormente?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Já fez tratamento protético anteriormente?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Já se submeteu à cirurgia bucal?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Já fez tratamento de implante dentário?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Sangra de maneira exagerada quando se corta ou extrai dentes?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei

### HISTÓRIA MÉDICA

Sofre de alguma doença?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Qual?	_____		
Há quanto tempo?	_____		
Está tomando algum medicamento sem orientação médica?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Nome comercial	_____		
Há quanto tempo?	_____		
Quando foi ao médico pela última vez?	_____		
Alguma alteração em sua saúde de um modo geral?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Mudança de peso nos últimos meses?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Padeceu de alguma doença grave anteriormente?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Qual?	_____		
Há quanto tempo?	_____		
Já esteve hospitalizado(a)?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
É portador de doença cardiovascular?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Qual?	_____		
Já teve hepatite?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Qual tipo?	<input type="checkbox"/> A	<input type="checkbox"/> B	<input type="checkbox"/> C
Já teve febre reumática?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Já teve endocardite infecciosa?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Tem dificuldade de respirar quando deitado?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Sua pressão é normal?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Pressão arterial no momento do exame:	Sistólica__	Diastólica__	
Fez exame de colesterol alguma vez?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Já fez exame para diabetes alguma vez?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Qual o resultado?	<input type="checkbox"/> Positivo	<input type="checkbox"/> Negativo	<input type="checkbox"/> Não sei
Sente sensação de boca seca frequentemente?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Tem problemas de infecções repetidas?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Tem ou teve alergia a algum medicamento, alimento ou substância?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Qual?	_____		
Toma(ou) algum medicamento com prescrição	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei



---

médica?			
Qual?	_____		
Sofre de asma ou bronquite?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Teve alguma doença venérea?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Qual?	_____		
Há quanto tempo?	_____		
Já fez exame para o diagnóstico de AIDS?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Fez tratamento de tumor na região da cabeça ou pescoço?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Quanto tempo?			
Já teve pneumonia?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Tem problema de Tireóide?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Qual?	_____		
Já foi diagnosticado(a) com osteoporose?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Tem ou teve o hábito de fumar?	<input type="checkbox"/> Atual	<input type="checkbox"/> Ex-fumante	<input type="checkbox"/> Nunca fumou
Tipo de fumo?	_____		
	-		
Tempo de fumo (em anos)?	_____		
	-		
Quantidade de cigarros por dia (em número de cigarros)?	_____		
	-		
Se ex-fumante, há quanto tempo deixou de fumar (em meses ou anos)	_____		
	-		
Se, fuma atualmente, pretende parar?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não fumo
Toma(ou) medicamento para depressão?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Quanto tempo? (em meses)	_____	<input type="checkbox"/> Atual	<input type="checkbox"/> Prévio
	-		
Toma(ou) medicamento para controlar nervosismo ou ansiedade?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Quanto tempo? (em meses)	_____	<input type="checkbox"/> Atual	<input type="checkbox"/> Prévio
	-		
Faz uso de bebida alcoólica?	<input type="checkbox"/> Atual	<input type="checkbox"/> Prévio	<input type="checkbox"/> Nunca
Qual produto bebe(ia) com mais frequência?	_____		
Quantidade por semana?	_____		
Já fez uso de drogas/entorpecentes?	<input type="checkbox"/> Atual	<input type="checkbox"/> Prévio	<input type="checkbox"/> Nunca
Tipo?	_____		
Tempo de uso?	_____		

---

**SAÚDE DA MULHER**

Toma anticoncepcional?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Está grávida?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
De quantos meses?	_____		
Já esteve grávida antes?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Quantas vezes?	_____		
Quantos filhos tem?	_____		
Já teve filhos de parto prematuro?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Sabe o motivo?	_____		
Já teve filhos com baixo peso ao nascer?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Qual o peso?	_____		
Está na menopausa?	_____		
Já passou da menopausa?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei
Faz reposição hormonal?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Não sei

**OBSERVAÇÕES:**


---



---



---



---



---

**APÊNDICE D** – Ficha para exame dentário e periodontal do paciente

Número do Prontuário: \_\_\_\_\_

**ÍNDICE CPOD**

(C – CARIADO; P – PERDIDO; O – OBTURADO; D – DENTE HÍGIDO)

18      17      16      15      14      13      12      11      21      22      23  
 24      25      26      27      28

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

48      47      46      45      44      43      42      41      31      32      33  
 34      35      36      37      38

**ÍNDICE DE BIOFILME: (0 = AUSÊNCIA; 1 = PRESENÇA)**

DENTE PRIMÁRIO	DENTE SECUNDÁRIO	V	MV	L
16	17			
14	15			
11	21			
22	12			
24	25			
26	27			
36	37			
34	35			
31	41			
42	32			
44	45			
46	47			

Número do Prontuário: \_\_\_\_\_

**EXAME PERIODONTAL:****PS – PROFUNDIDADE DE SONDAAGEM****NI – NÍVEL DE INSERÇÃO****SS – SANGRAMENTO À SONDAAGEM (0 = AUSÊNCIA; 1 = PRESENÇA)**

DENTE PRIMÁRIO	DENTE SECUNDÁRIO	Índice	DV	V	MV	DL	L	ML
16	17	OS						
		NI						
		SS						
14	15	OS						
		NI						
		SS						
11	21	OS						
		NI						
		SS						
22	12	OS						
		NI						
		SS						
24	25	OS						
		NI						
		SS						
26	27	OS						
		NI						
		SS						
36	37	OS						
		NI						
		SS						
34	35	OS						
		NI						
		SS						
31	41	OS						
		NI						
		SS						
42	32	OS						
		NI						
		SS						
44	45	OS						
		NI						
		SS						
46	47	OS						
		NI						
		SS						

Número do Prontuário: \_\_\_\_\_

**OBSERVAÇÕES:**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**TRATAMENTO NECESSÁRIO:**

- PERIODONTIA
- DENTÍSTICA RESTAURADORA
- ENDODONTIA
- PATOLOGIA ORAL
- IMPLANTODONTIA
- CIRURGIA BUCO-MAXILO
- PRÓTESE FIXA
- PRÓTESE REMOVÍVEL
- PRÓTESE TOTAL
- ODONTOPEDIATRIA
- ORTODONTIA

## ANEXO

**ANEXO A** – Cópia da aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté.



**Universidade de Taubaté**  
Autarquia Municipal de Regime Especial  
Reconhecida pelo Dec. Fed. Nº 78.924/76  
Recredenciada pela Portaria CEE/GP nº 30/03  
CNPJ 45.176.153/0001-22

**Reitoria**  
Rua 4 de Março, 432 Centro Taubaté-SP 12020-270  
tel.: (12) 225.4100 fax: (12) 232.7660 www.unitau.br reitoria@unitau.br

**PRPPG - Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**  
Rua Visconde do Rio Branco, 210 Centro Taubaté-SP 12020-040  
tel. (12)225-4217 225-4143 fax: (12)232-2947 edwiges@unitau.br

### DECLARAÇÃO

**Protocolo CEE/UNITAU nº 148/05** (Esse número de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto)

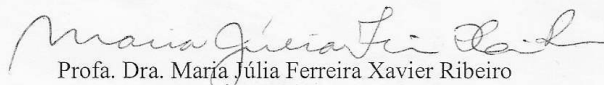
**Projeto de Pesquisa:** *Avaliação de periodontopatógenos em amostra de conveniência de jovens e adultos da cidade de Anápolis-GO*

**Pesquisador(a) Responsável:** Paulo César Tavares

**Apresentar relatório final ao término da pesquisa:** 31/01/2006

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião de **01/07/2005** e no uso das competências definidas na Resolução CNS/MS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**, após atendimento às pendências.

Taubaté, 01 de agosto de 2005

  
**Prof. Dr. Maria Júlia Ferreira Xavier Ribeiro**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté

Autorizo cópia total ou parcial desta obra, apenas para fins de estudo e pesquisa, sendo expressamente vedado qualquer tipo de reprodução para fins comerciais sem prévia autorização específica do autor.

---

Paulo César Tavares  
Taubaté – SP, Janeiro 2006.