PRISCILA CORRAINI

**Perfis microbianos subgengivais e doenças periodontais em uma população
isolada brasileira**

São Paulo

2012

PRISCILA CORRAINI

Perfis microbianos subgengivais e doenças periodontais em uma população isolada brasileira

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Emílio Pustiglioni

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Corraini, Priscila

Perfis microbianos subgingivais e doenças periodontais em uma população isolada brasileira : [versão corrigida] / Priscila Corraini; orientador Francisco Emílio Pustiglioni.

-- São Paulo, 2012.

87p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida de acordo com sugestões da Banca Examinadora em 29/02/2012.

1. Doenças periodontais – Diagnóstico. 2. Biofilmes. 3. Prevalência. 4. Microbiologia. 5. Epidemiologia. I. Pustiglioni, Francisco Emílio. II. Título.

Corraini P. Perfis microbianos subgengivais e doenças periodontais em uma população isolada brasileira. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à toda a **população de Cajaíba** que apoiou este projeto com convicção, contribuindo com um objetivo final: melhorar as condições de saúde geral e bucal por meio deste documento, em uma área pouco lembrada pelos órgãos governamentais no Brasil. Agradeço especialmente ao Sr. Ceceu e Dona Yonne, a Dona Dica e Iolanda, ao Japão, a Rejane, Ananias e João Lucas, a Aninha, ao Valdinei, e a todos aqueles que fizeram deste trabalho algo real, fornecendo muitas vezes um lugar para dormir, um copo de café, um almoço, uma carona de barco, e dando-me confiança para a execução deste projeto.

A **Deus**, por colocar no meu caminho este projeto tão ardiloso e cheio de obstáculos, mas tão recompensador. Com certeza aprendi muito com ele, conheci pessoas incríveis, e sou outra pessoa após essa longa e difícil jornada. Foi também por meio dos desafios encontrados nesse estudo que outra importante porta foi aberta, que acabou me levando a morar na Dinamarca, onde sigo ampliando meus horizontes.

Aos meus pais **Orlando e Izildinha**, que sempre me guiaram quanto aos corretos princípios, me inspiraram pelas pessoas excepcionais que são, e que além de tudo, sempre estiveram presentes com amor e confiança. Devo tudo o que sou hoje a vocês, que sempre me apoiaram e me mostraram a importância dos estudos na vida.

À **minha avó Helena**, por estar sempre viva em meu coração, lembrando-me de sua eterna bondade, doçura e perseverança em ajudar os outros, ensinando-me, apesar dos poucos anos em que vivemos juntas, a entender que muitas vezes a sabedoria está em perdoar e amar ao outro, aceitando todas as diferenças entre nós.

AGRADECIMENTOS

“Before you act, listen.

...Before you quit, try”

Ernest Hemingway

Ao meu orientador, **Prof. Francisco Emílio Pustiglioni**. Com certeza tive a incrível sorte de começar minha pós-graduação na Periodontia sob a sua mentoria, que já conta com 7 anos de intensa convivência! Por confiar desde o início em mim e no projeto, apoiando-me, mesmo nos momentos difíceis. Pensar é o trabalho mais árduo, e seguramente é o bem mais valioso que eu levei deste curso.

Ao **Prof. Roberto Lotufo** (*in memoriam*). Pela amizade, confiança e alegria. Foi sua a idéia em começar a realizar o exame microbiológico neste estudo.

Ao **Prof. Cláudio Mendes Pannuti**. Tão difícil expressar em palavras todos os anos trabalhando juntos. Sem você certamente não teria chegado até aqui.

Ao **Prof. José Roberto Cortelli**, por me apoiar em todos os momentos na realização deste doutorado por meio do planejamento e execução das análises e interpretação dos dados microbiológicos deste estudo. Ao **Gilson Franco, Davi Aquino e Sheila Cortelli** pela enorme ajuda na metodologia e execução de toda a fase laboratorial do estudo.

Ao **Sandro**, por estar presente todos estes anos comigo em Cajaíba no veleiro e em campo, fazendo chuva ou sol, ensinando-me a trabalhar em situações de campo.

À **Vibeke Bælum**, por haver me inspirado a ingressar no campo da epidemiologia, desde o início da realização deste trabalho, em 2005, por meio da leitura da sua tese de Doctor Odont, e por ter contribuído durante essa tese de doutorado como co-tutora durante minha estadia na Dinamarca. Durante nossa convivência de trabalho,

que já dura 5 anos, você continua sempre a me inspirar, como ótima mentora que é, com novas idéias e seu brilhantismo.

Ao **Prof. Giuseppe Alexandre Romito**, por sempre surgir com novas idéias e argumentações, pelos conselhos e apoio.

A **José Eduardo Rittes** e **Eduardo Viegas** pelo apoio durante toda a fase de campo, sempre prestativos em ajudar, acreditando no trabalho.

Aos Professores **João Batista César Neto** e **Maria do Rosario Dias de Oliveira Latorre**, pelas idéias e contribuições durante o meu exame de qualificação.

Aos professores da disciplina de periodontia **Giorgio de Micheli**, **Luciana Saraiva**, **Luiz Lima**, **Marco Georgetti**, **Koto**, **Marina Conde**, **Silvia Rosana Carneiro** (*in memoriam*), que me ensinaram muito e enriqueceram meus conhecimentos em periodontia.

À **Rosana Tramontina**, pela amizade, constante incentivo, e que, com sua maneira perseverante e criativa de trabalhar, me guiou e me inspirou no caminho da periodontia desde os primeiros passos.

A todos os meus colegas da pós-graduação da FOU SP. A todos mesmo, já que passando por 7 anos entre mestrado e doutorado, acabei participando da convivência de diversas turmas. Sem esquecer, claro dos meus primeiros colegas de mestrado, **Hsu**, **Ivan**, **Verô**, **Giovane**, **Valéria**, **Adriane**, **Takiy**, **Fábio** (querido sócio!) e **Carla**. Um agradecimento especial também à Isabela e Cissa, pela ajuda e apoio na correria da finalização deste trabalho!

À **Márcia**, **Marília** e **Vera**, funcionárias do departamento de estomatologia, pela ajuda com os prazos, relatórios, materiais e burocracias.

À **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa (protocolos nº 04/15287-4 e 08/55404-0) e pela bolsa de doutorado (protocolo nº 09/50555-3).

"Chegou o momento de expressar-se, de viver a realidade sem esquecer a natureza sonhadora. De buscar, errar e amar sem ter medo, de dizer para que veio ao mundo sem olhar para trás e escolher as lutas. Conhecer novas culturas e assim entender que a palavra respeito tem diversos significados; e que aprender que calar também tem seu significado diante a imponência. De simplificar o que antes era complicado e assim, poder desfrutar de pequenas coisas antes despercebidas, e entender que, os acontecimentos e o tempo são totalmente incoerentes, aceitando cada momento como ele é. Deixar o silêncio manifestar a voz interior e, enfim, encontrar a paz".

Priscila Corraini

RESUMO

Corraini P. Perfis microbianos subgengivais e doenças periodontais em uma população isolada brasileira [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Original.

OBJETIVOS: investigar a prevalência e a presença de distintos perfis microbianos no biofilme subgengival e avaliar o seu papel no diagnóstico e risco das doenças periodontais destrutivas em uma população isolada brasileira sem acesso à tratamento periodontal e tradição ao uso de métodos de higiene bucal. **MATERIAL E MÉTODOS:** A população-alvo consistiu de todos os indivíduos com 12 ou mais anos de idade (N= 264) residentes na microárea Cajaíba, identificados por meio de um censo. Estes indivíduos foram entrevistados por meio de um questionário estruturado e submetidos a um exame periodontal completo que consistiu na avaliação de 6 sítios por dente em toda a boca e na coleta de amostras do biofilme subgengival em 4 sítios por indivíduo. A detecção dos micro-organismos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *C. rectus*, bem como a distribuição dos sorotipos e presença do clone JP2 do *A. actinomycetemcomitans* foram avaliadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). **RESULTADOS:** *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 25% dos indivíduos, enquanto que *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* e *C. rectus* foram detectados em 64%, 59%, 38% e 90% dos indivíduos, respectivamente. Entre as amostras positivas para o *A. actinomycetemcomitans* (n=42), 18 (42%) representaram o sorotipo a, 2 (5%) o sorotipo b, 19 (46%) o sorotipo c, 1 (2%) o sorotipo e, e 4 (10%) foram não-sorotipáveis. O clone JP2 do *A. actinomycetemcomitans* não foi detectado em nenhum indivíduo desta população. Dois perfis microbianos subgengivais foram identificados: (perfil 1) nenhum dos microrganismos estudados, com exceção do *C. rectus* (n = 31), e (perfil 2) co-ocorrência de *P. gingivalis* e *T. forsythia* (n = 77). O perfil 1 demonstrou valores de sensibilidade extremamente baixos, enquanto que o perfil 2 apresentou valores de sensibilidade variados na identificação dos desfechos subrogados periodontais

avaliados, e valores de baixos a moderados para a especificidade. Os seguintes perfis subgengivais estiveram associados com a prevalência de perda clínica de inserção (NCI) e profundidade de sondagem (PS) nos modelos finais de regressão logística múltipla, ajustados para variáveis demográficas, biológicas e comportamentais: *T. forsythia* (PS e NCI ≥ 5 mm, e ≥ 7 mm), *P. gingivalis* (NCI ≥ 7 mm) e o perfil 2 (PS ≥ 5 mm e NCI ≥ 7 mm). CONCLUSÕES: Os micro-organismos periodontais estudados foram prevalentes nessa população isolada. Esta população apresentou predominância dos sorotipos *a* e *c* do *A. actinomycetemcomitans*. Dois perfis microbianos subgengivais puderam ser identificados nesta população isolada. Porém, eles não foram superiores ao diagnóstico de parâmetros clínicos periodontais específicos, quando adicionados à informação clínica tradicional. Perfis microbianos subgengivais apresentando *T. forsythia* como indicador de risco foram significativamente associados com o aumento da PS e do NCI nessa população isolada.

Palavras-chave: Biofilme subgengival. Doenças Periodontais. Epidemiologia. Marcador(es) diagnóstico(s). Microbiologia. Perfis microbianos.

ABSTRACT

Corraini PC. Subgingival microbial profiles and periodontal diseases in an isolated population from Brazil [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

AIMS: To investigate the prevalence and describe the subgingival microbial profiles of selected periodontal pathogens in the subgingival biofilm; and assess their role as possible diagnostic markers or risk indicators for destructive periodontal diseases in a periodontally untreated and isolated population from Brazil. **MATERIAL AND METHODS:** The target population consisted of all subjects aged ≥ 12 years ($n=264$) in an isolated Brazilian population. A full-mouth clinical examination was conducted, and pooled subgingival plaque samples were obtained from four sites per subject. PCR analyses were performed to identify the following microorganisms: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* and *C. rectus*, as well as the *A. actinomycetemcomitans* serotype distribution and JP2 clone detection. **RESULTS:** *A. actinomycetemcomitans* was detected in 25% of the subjects, whereas *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* and *C. rectus* were detected in 64%, 59%, 38% and 90% of the subjects, respectively. From the *A. actinomycetemcomitans* positive isolates ($n=42$), 18 (42%) were serotype a, 2 (5%) b, 19 (46%) c, 1 (2%) e, and 4 (10%) were non-serotypeable. None of the strains belonged to the JP2 clone. Two specific subgingival microbial profiles were identified: (1) In one, only *C. rectus* could or not be present ($n = 31$), while in the other, (2) Co-occurrence of *T. forsythia* and *P. gingivalis* was observed ($n = 77$). Profile 1 showed very low sensitivity values, and profile 2 showed varying sensitivity values for the identification of the various periodontal states, and considerably low to moderate specificity values. The following subgingival profiles were significantly associated with the prevalence of periodontal attachment loss (CAL) and probing depth (PD) in the final multiple logistic regression models adjusted for demographic, biological and behavioral variables: *T. forsythia* (PD and CAL ≥ 5 mm and ≥ 7 mm), *P. gingivalis* (CAL ≥ 7 mm) and the profile 2 (PD ≥ 5 mm and CAL ≥ 7 mm). **CONCLUSIONS:** The five studied periodontal

microorganisms were prevalent in this isolated population. The *A. actinomycetemcomitans* positive subjects consisted predominantly of *a* and *c* serotypes. Two specific microbial profiles could be identified in this isolated population.

They did not result in significant superior diagnostic accuracy when compared to traditional clinical markers. Subgingival microbial profiles presenting *T. forsythia* as risk indicator were significantly associated with increased PD and CAL in this isolated population.

Keywords: Diagnostic marker(s). Epidemiology. Microbial profiles. Microbiology. Periodontal diseases. Subgingival biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Localização geográfica da reserva ecológica da Juatinga e da microárea Cajaíba	27
Figura 4.2 - População alvo e número final de indivíduos que receberam coleta do biofilme subgengival	28
Figura 4.3 - Exemplo de coleta do biofilme subgengival na população-alvo.....	32
Figura 4.4 - Fotografia do gel de agarose indicando os produtos de PCR primer - específico para o micro-organismo <i>C. Rectus</i> . 01 – Ladder 100pb, 02 – Controle positivo, 3-19 – Amostras, 21 – Controle negativo	35
Figura 4.5 - Exemplo de output realizado pelo software DTREG para uma árvore de decisão com o número máximo de 3 níveis permitido para prever o desfecho prevalência de CAL $\geq$ 5 mm, por meio das variáveis incluídas no cenário 1.	42
Figura 5.1 - Prevalência dos 5 micro-organismos estudados de acordo com a idade	47
Figura 5.2 - Árvore de decisão para os micro-organismos <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>T. forsythia</i> e <i>P. gingivalis</i> na população-alvo.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Parâmetros demográficos, biológicos, comportamentais e clínicos dos indivíduos que permitiram (n = 170) ou não (n = 25) a coleta do biofilme subgengival	46
Tabela 5.2 - Erro de classificação total, sensibilidade e especificidade dos dois perfis microbianos subgengivais no diagnóstico de indivíduos de acordo com os 6 desfechos periodontais.	51
Tabela 5.3 - Dados demográficos, clínicos e comportamentais com (Cenário 1) ou sem (Cenário 2) o auxílio da informação fornecida pelo exame microbiológico no diagnóstico de indivíduos com prevalência e extensão de NCI $\geq$ 5 mm.....	52
Tabela 5.4 - Dados demográficos, clínicos e comportamentais com (Cenário 1) ou sem (Cenário 2) o auxílio da informação fornecida pelo exame microbiológico no diagnóstico de indivíduos com pelo menos um sítio apresentando PS $\geq$ 5 mm.....	54
Tabela 5.5 - Análises de regressão logística univariada entre as variáveis dependentes prevalência de NCI $\geq$ 5 mm, NCI $\geq$ 7mm, PS $\geq$ 5 mm, e as variáveis independentes microbiológicas.	55
Tabela 5.6 - Análises de regressão logística múltipla entre as variáveis dependentes prevalência de NCI $\geq$ 5 mm, NCI $\geq$ 7 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, de acordo com a abordagem #1	57
Tabela 5.7 - Análises de regressão logística múltipla entre as variáveis dependentes prevalência de NCI $\geq$ 5 mm, NCI $\geq$ 7 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, de acordo com a abordagem #2	58
Tabela 5.8 - Análises de regressão logística múltipla entre a variável dependente prevalência de PS $\geq$ 5 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, de acordo com a abordagem #1	59
Tabela 5.9 - Análises de regressão logística múltipla entre a variável dependente prevalência de PS $\geq$ 5 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, de acordo com a abordagem #2	60

Tabela 5.10 -Distribuição dos perfis microbianos subgengivais com relação à diferentes categorias de presença de cálculo supragengival, e análises de regressão logística múltipla entre as variáveis dependentes prevalência de NCI ≥ 5 mm, ≥ 7 mm e PS ≥ 5 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, estratificada por % de sitios apresentando calculo supragengival, e controlada pela variável independente tabagismo.....	61
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A.a</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
CCI	coeficiente de correlação intra-classe
<i>C.r</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
CSE	condição sócio-econômica
GCP	glicemia capilar plasmática
gl	graus de liberdade
IC	intervalo de confiança
JEC	junção esmalte-cimento
K_w	kappa ponderado
MG	margem gengival
N	número
NCI	nível clínico de inserção
ONG	organização não-governamental
OR	“odds ratio”
pb	pares de base
PCR	“polymerase chain reaction”
<i>P.i</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P.g</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PS	profundidade de sondagem
RG	retração gengival
RJ	Rio de Janeiro
<i>T.f</i>	<i>Tannerella forsythia</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
$\sim$	aproximadamente
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
$>$	maior
$\geq$	maior ou igual
$\text{\textcircled{R}}$	marca comercial registrada
$<$	menor
$\leq$	menor ou igual
-	menos
m	metro
μL	microlitro
mL	mililitro
mg/dL	miligramas por decilitro
mm	milímetro
min	minuto
#	número
%	porcentagem
rpm	rotações por minuto
s	segundo
V/cm ²	Volts por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
5 RESULTADOS.....	46
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 EPIDEMIOLOGIA DESCRITIVA	21
2.2 EPIDEMIOLOGIA CLÍNICA	21
2.3 EDPIDEMIOLOGIA ANALÍTICA	22
2.3.1 Fatores de risco para as doenças periodontais	22
2.3.1.1 Micro-organismos presentes no biofilme subgengival	22
2.3.1.2 Complexidade e avaliação de fatores de risco em epidemiologia	23
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E CASUÍSTICA	26
4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO	26
4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	28
4.4 COLETA DE DADOS	29
4.4.1 Entrevista	29
4.4.2 Procedimentos clínicos	30
4.2.2.1 Teste de glicemia capilar plasmática (GCP) casual	30
4.2.2.2 Exame clínico periodontal	30
4.2.2.3 Exame microbiológico - coleta do biofilme subgengival	31
4.4.2 Procedimentos laboratoriais	33
4.5 AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DAS VARIÁVEIS	36
4.5.1 Entrevista por meio do questionário estruturado	36
4.5.2 Exame clínico periodontal	37
4.5.3 GCP casual	38
4.5.4 Procedimentos laboratoriais	38
4.6 ANÁLISE DE DADOS	38
4.6.1 Armazenamento dos dados	38
4.6.2 Análise estatística	39
4.6.2.1 Objetivos 1 e 2	39
4.6.2.2 Objetivo 3	39
4.6.2.3 Objetivo 4	40

4.6.2.4 Objetivo 5	43
5 RESULTADOS	46
5.1 OBJETIVO 1	47
5.2 OBJETIVO 2	48
5.3 OBJETIVO 3	48
5.4 OBJETIVO 4	50
5.5 OBJETIVO 5	55
6 DISCUSSÃO	62
6.1 OBJETIVOS 1 E 2	62
6.1.1 <i>A. actinomycetemcomitans</i>	62
6.1.2 <i>P. gingivalis</i>, <i>P. intermedia</i>, <i>C. rectus</i> e <i>T. forsythia</i>	64
6.2 OBJETIVO 3	64
6.3 OBJETIVO 4	65
6.4 OBJETIVO 5	68
6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
7 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

A presença do biofilme dental é responsável pelo início e a progressão das doenças periodontais destrutivas (Heitz-Mayfield, 2005). No entanto, o desenvolvimento da teoria da placa específica (Loesche, 1976), o caráter multifatorial das doenças periodontais, e frequentes observações demonstrando sua presença do ambiente supragengival como pobre preditor dos sinais clínicos destas doenças (Abdellatif; Burt, 1987), levaram à sugestão de que outros fatores etiológicos, tanto mediadores quanto intermediadores dessa relação, também deveriam ser investigados. Dentre estes fatores, dois deles ganharam grande ênfase: o estudo de micro-organismos periodontais (Papapanou et al., 1997, 2002; Haubek et al., 2008) e, mais recentemente, fatores da resposta do hospedeiro.

O estudo de perfis ou complexos microbianos subgengivais pode implicar na tentativa de distinguir ou diagnosticar estados de saúde ou doença periodontal (Socransky; Haffajee, 1998; Haffajee; Socransky, 2006; Dahlén, 2006), além de identificar fatores associados com as doenças periodontais destrutivas (Papapanou et al., 2002; Ezzo; Cutler, 2003). Um dos poucos estudos clínicos investigando a co-ocorrência de micro-organismos no biofilme subgengival foi descrito em 1998 (Socransky; Haffajee 1998). Apesar de constituir-se no estudo referência para o entendimento destes perfis microbianos e sua relação com as doenças periodontais, ele consiste de investigações de profundidade de sondagem e sangramento à sondagem, em nível de sítio, em uma amostra de pacientes com histórico prévio de doença periodontal. Portanto, é de extrema importância que estudos em diferentes populações, levando também em consideração o indivíduo como unidade de análise ou a estrutura estratificada e dependente dos dados relacionados ao sítio, dente e indivíduo, sejam conduzidos nessa área para investigar essa questão (Paster et al., 2006).

Estudos epidemiológicos em populações isoladas, geralmente encontradas em países em desenvolvimento, fornecem uma oportunidade única para estudar o curso natural das doenças periodontais. Isto ocorre devido à um controle natural de fatores de confusão, obtido pela ausência de intervenções terapêuticas periodontais supra ou subgengivais, além do uso limitado de dispositivos de higiene oral, e medicamentos (ex. antibióticos e anti-inflamatórios)

(Corraini, 2007). Desta maneira, também permite uma melhor avaliação da sua relação com a microbiota subgengival, já que nestas populações apresenta-se com um padrão caracterizado por uma colonização estável, e não transitória (Ximenez-Fyvie et al., 2000; Dowsett et al., 2002; Papapanou et al., 2002).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os principais problemas de saúde bucal que atingem grande parcela da população mundial, são a cárie dentária e as doenças periodontais (Albandar; Brunelle; Kingman, 1999; Petersen et al., 2005). Ambos possuem etiologia microbiana (biofilme dental), ou estão associados a micro-organismos específicos presentes no biofilme dental (Dahlén, 2006).

A etiologia bacteriana das doenças periodontais tem sido investigada durante boa parte do último século e, há cerca de quatro décadas, o fato de o biofilme dental “per se” não constituir-se causa suficiente para o início e progressão das doenças periodontais destrutivas, levou ao surgimento de duas teorias: a teoria da placa específica (Loeshe, 1976) e inespecífica (Theilade, 1986). Durante o mesmo período, o avanço da epidemiologia na Periodontia permitiu um melhor entendimento da etiologia multifatorial das doenças periodontais (Baelum et al. 1998).

Seguindo a linha de pensamento da teoria da placa específica, o controle de micro-organismos específicos no biofilme subgengival, seja por meio de tratamento (ex. antibioticoterapia) ou prevenção (ex. vacinação, Dhingra; Vandana, 2010) específica, foi visto como uma abordagem mais efetiva quando comparado aos métodos tradicionais obtidos por meio do controle mecânico do biofilme supra e subgengival (Theilade, 1986). Desde então, testes microbiológicos foram implementados como uma possibilidade de aumentar a acurácia e qualidade no diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças periodontais destrutivas (Dahlén, 2006).

Entretanto, a evidência clínica disponível avaliando estes testes ainda não é unânime (Listgarten; Loomer, 2003) e consiste, na maioria dos casos, em estudos avaliando a microbiota subgengival presente em diversas modalidades de doenças periodontais e/ou na sua progressão (Haffajee; Socransky, 1994; Kinney et al., 2011), além de estudos avaliando a efetividade de diferentes abordagens de tratamento, específicas no controle de micro-organismos no ambiente subgengival, nos parâmetros clínicos de diversas modalidades de doenças periodontais (Sampaio et al., 2011; Sgolastra et al., 2011). Ao mesmo tempo, poucos estudos populacionais (Papapanou et al., 2002; Rylev; Kilian, 2008), levando em consideração o indivíduo

como unidade de análise, e a etiologia multifatorial das doenças periodontais destrutivas foram realizados para avaliar a mesma questão. Este, além de outros fatores, demonstra o claro desvínculo entre o que é produzido como evidência científica em estudos clínicos e epidemiológicos na Periodontia.

Estudos populacionais permitem a avaliação da etiologia microbiana das doenças periodontais por meio da seleção aleatória de indivíduos, sem levar em consideração o estado periodontal prévio e sem a necessidade de tratamento (Rothman, Greenland; Lash, 2008). Ela pode ser avaliada por meio da variação da prevalência de micro-organismos específicos no biofilme dental (Epidemiologia Descritiva), estudo do seu papel no diagnóstico (Epidemiologia Clínica) e no risco (Epidemiologia Analítica) (Dahlén, 2006) das doenças periodontais destrutivas.

2.1 EPIDEMIOLOGIA DESCRITIVA

A diferença na prevalência mundial de micro-organismos presentes no biofilme subgengival tem sido utilizada com a finalidade de entender as diferenças na prevalência das doenças periodontais destrutivas (Rylev; Kilian, 2008). Esta estratégia é também utilizada em doenças com etiologia multifatorial complexa, como, por exemplo, a asma (Pearce, 2011). Além disso, sua importância está diretamente relacionada a fatores causais que estão presentes em alta frequência em toda a população (ex. biofilme supragengival). No entanto, tentativas de gerar conclusões, baseadas na comparação da variação na prevalência de micro-organismos em diferentes populações, ainda são limitadas por confiar no fato de que diferentes métodos de coleta subgengival e laboratoriais empregados por cada estudo são compatíveis, o que ainda não é uma realidade (Rylev; Kilian, 2008).

2.2 EPIDEMIOLOGIA CLÍNICA

A epidemiologia clínica estuda a aplicação de princípios metodológicos oriundos da epidemiologia em questões clínicas relacionadas ao diagnóstico,

prognóstico e tratamento. (Fletcher; Fletcher, 2005; Rothman; Greenland; Lash, 2008). Seu objetivo é responder às três principais questões centrais do mundo clínico:

- 1) Qual é o curso esperado da doença em questão em um paciente sem intervenção clínica?
- 2) Como diversos testes diagnósticos se comportam com relação à classificação da doença ou condição válida e, portanto, influenciam na escolha do tratamento?
- 3) Qual é a probabilidade do tratamento escolhido reduzir os sinais e sintomas da doença ou condição e, portanto, melhorar o seu prognóstico?

2.3 EPIDEMIOLOGIA ANALÍTICA

2.3.1 Fatores de risco para as doenças periodontais

2.3.1.1. Micro-organismos presentes no biofilme subgengival

Um número finito de micro-organismos é atualmente aceito tanto como agentes causais quanto como agentes fortemente relacionados com a presença destas doenças (Consensus Report, 1996).

Haffajee e Socransky (1994), adaptando os postulados de Koch (Koch, 1884), declararam que os seguintes critérios devem estar presentes para que estes possam ser considerados periodontopatógenos:

- 1- Associação, isto é, presença de elevados *odds ratios* em condições de doença;
- 2- Eliminação, isto é, conversão da condição de doença para saúde quando supressão destes patógenos;
- 3- Desenvolvimento de resposta do hospedeiro;
- 4- Presença de fatores de virulência;

- 5- Evidência de estudos em animais em concordância com estudos em humanos; e
- 6- Suporte por meio de estudos analíticos (avaliação de riscos).

No entanto, embora os postulados de Koch para inferir causalidade tenham sido pioneiros na identificação os agentes responsáveis pelas doenças infecciosas (Koch, 1884; Last, 2000; Susser; Susser, 1996), quase um século depois, o conceito de *web of causation* foi proposto como uma maneira de enfatizar a importância das múltiplas causas das doenças (MacMahon; Pugh; Ipsen, 1960).

Baseado nos 6 critérios anteriormente descritos (Consensus Report, 1996), 3 espécies [*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, e *B. forsythus* (renomeada como *Tannerella forsythia*)] foram identificadas como fatores causais para as doenças periodontais. Estas espécies não são as únicas fortemente associadas às doenças periodontais dentre aquelas atualmente reconhecidas, porém, são aquelas para as quais quantidade suficiente de evidência científica foi acumulada (Papapanou, 2002).

Além disso, a presença de cepas específicas de algumas espécies bacterianas, em particular, a cepa JP2 do *A. actinomycetemcomitans*, , tem sido positivamente associada em estudos transversais e longitudinais à maior ocorrência de doenças periodontais destrutivas, principalmente em indivíduos de descendência africana (Haubek et al., 2004, Contreras et al., 2000), e também brasileira (Cortelli et al., 2005). Isto se deve à maior virulência bacteriana destas cepas específicas (Ex. aumento da produção de leucotoxinas no clone JP2 de A.a.) (Brogan et al., 1994).

2.3.1.2 Complexidade e avaliação de fatores de risco em epidemiologia

Em epidemiologia, a avaliação de fatores de risco são tipicamente organizadas entre três diferentes tipos de variáveis: a exposição, o desfecho e o(s) fator(es) de confusão. A exposição e o desfecho são usualmente determinados pela questão causal sob investigação. O(s) fator(es) de confusão, por outro lado, não são claramente definidos (Hernán et al., 2002). Como regra geral, o fator de confusão deve estar tanto associado (causalmente) com o desfecho de interesse, quanto

causalmente ou não-causalmente associado com a exposição (Rothman; Greenland; Lash, 2008).

No entanto, algumas exceções na regra geral de determinação dos fatores de confusão são inevitáveis, quando no estudo de doenças com causalidade complexa, tais como:

- 1) A presença de confundimento devido à associações espúrias (Szklo; Javier Nieto, 2007);
- 2) A presença do fator de confusão como uma variável intermediária (Szklo; Javier Nieto, 2007), ou como marcador de risco (Hernán et al., 2002), na associação causal entre a exposição e o desfecho;
- 3) Correlação excessiva entre o fator de confusão e a exposição de interesse (Szklo; Javier Nieto, 2007).

Além disso, a evolução nas áreas de biologia molecular e genética tem levado à ampla utilização dos termos “epidemiologia molecular” e “epidemiologia genética”, para definir o estudo de relações complexas entre fatores de risco operando dentro do indivíduo com fatores de risco coletivos e individuais. Ela tem sido amplamente criticada (Baelum; Lopez, 2004; Susser; Susser, 1996), principalmente por perder o foco nas implicações e origens da saúde pública.

No entanto, esta complexidade tem envolvido o desenvolvimento e utilização de diferentes metodologias, teorias causais (Greenland; Brumback, 2002; Rothman, Greenland; Lash, 2008) e múltiplas estratégias de análise na epidemiologia. Sua razão final é integrar a informação fornecida por múltiplos campos de pesquisa, utilizando a tecnologia apropriada para adaptar-se à hipótese em questão, e não o contrário (Pearce, 2011), isto é, gerar hipóteses com o objetivo de utilizar novas tecnologias.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo transversal foram:

1. Avaliar a prevalência das espécies bacterianas *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* e *C. rectus* no biofilme subgengival de uma população isolada brasileira;
2. Avaliar a sorotipagem e presença da cepa altamente leucotóxica de *A. actinomycetemcomitans*;
3. Investigar a presença e descrever perfis microbianos presentes no biofilme subgengival;
4. Investigar a habilidade de determinados perfis em diagnosticar estados de doença e saúde periodontal;
5. Investigar possíveis associações entre determinados perfis microbianos subgengivais e parâmetros clínicos periodontais nessa população.

4 CASUÍSTICA - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi conduzido um estudo transversal, com o objetivo inicial de avaliar doenças periodontais destrutivas e fatores associados na população isolada presente na microárea Cajaíba, pertencente ao município de Paraty, estado brasileiro do Rio de Janeiro, localizado na região costeira sudeste do Brasil.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população alvo compreendeu todos os indivíduos com mais de 12 anos de idade, que consentiu com os objetivos do estudo. A idade de 12 anos foi considerada, por representar a idade na qual, na maioria dos casos, a dentição permanente já está completamente erupcionada (WHO, 1997).

A microárea Cajaíba, pertencente ao município de Paraty-RJ, corresponde à região da reserva ecológica da Juatinga (Lei nº 1.859, de 01/10/1991; Decreto nº 17.981, de 30/10/1992). Esta população, segundo dados da Secretaria Municipal de Saúde de Paraty, em 2003 (Corraini, 2007) compreendeu mais de 642 habitantes, vivendo em seis praias: Pouso do Cajaíba, Ipanema, Calhaus, Galhetas, Itaoca e Praia Grande.

A população de Cajaíba permanece efetivamente isolada do restante do continente pela existência dos seguintes limitantes geográficos: as Pontas da Cajaíba (Figura 4.1) e da Juatinga; e a reserva ecológica da Juatinga, onde existe também o pico do Cairuçu (1.100 m de altitude). Devido ao seu isolamento, é freqüente a presença de consangüinidade entre os indivíduos desta população.

A falta de dados atualizados a respeito dos elementos unitários da população alvo, e da prevalência de doença periodontal nesta população, levou à realização de um censo durante a realização da primeira fase do estudo (2006) (Levy; Lemeshow, 1999). Este demonstrou que 358 indivíduos vivem na área, e

destes, 264 indivíduos possuíam 12 ou mais anos de idade. Destes 264 indivíduos, 214 (81,1%) aceitaram participar do estudo. Do total de 195 indivíduos dentados, 170 aceitaram submeter-se à coleta do biofilme subgengival (Figura 4.2), já que o tempo de exame clínico incluindo a mesma excedia 1 hora. Informações mais detalhadas sobre a população de estudo, tamanho da amostra e distribuição dos elementos unitários podem ser encontradas em publicações anteriores (Corraini 2007; Corraini et al., 2008a,b).

Figura 4.1 - Localização geográfica da reserva ecológica da Juatinga e da microárea Cajaíba

Figura 4.2 - População alvo e número final de indivíduos que receberam a coleta do biofilme subgengival

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi autorizado, previamente à sua realização, pelos líderes de cada comunidade de Cajaíba e pelo prefeito de Parati, centro administrativo responsável pela área em que Cajaíba se encontra, após o detalhamento de seus objetivos e benefícios para a população. Além disso, o protocolo de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A).

Devido à alta frequência de analfabetismo na população alvo, o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B) foi lido a todos os indivíduos elegíveis. A todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo foi solicitada a sua assinatura, apenas após o completo entendimento de seu conteúdo. No caso de menores de idade, foi solicitada a um responsável legal a assinatura.

Este estudo contou com a parceria da ONG Sorriso Marinho. Os participantes deste estudo receberam tratamento urgencial, quando necessário, por meio de extrações ou restaurações temporárias pelos dentistas ligados a esta ONG.

4.4 COLETA DE DADOS

A coleta de dados em campo foi conduzida entre outubro de 2005 e novembro de 2006.

4.4.1 Entrevista

Todos os indivíduos elegíveis da população que consentiram em participar desse estudo receberam visitas em suas residências e foram convidados a participar de uma entrevista realizada por um único entrevistador, baseado em um questionário estruturado (Anexo C).

As seguintes informações foram coletadas durante as entrevistas: idade (em anos), gênero, número de indivíduos vivendo na mesma residência (aglomeração familiar), presença de renda monetária (sim / não) e, se aplicável, seu valor mensal aproximado, em reais. Os indivíduos também foram questionados quanto à possibilidade de ler e escrever (sim / não), escolaridade (em anos), se recebeu tratamento odontológico durante a vida (sim / não). A frequência de higiene bucal diária e hábitos de tabagismo também foram investigados. As questões relacionadas ao tabagismo incluíram situação atual ou passada de tabagismo (sim / não), duração do hábito para fumantes e ex-fumantes (em anos), tempo desde o término do hábito para ex-fumantes (em anos), tipo de hábito de tabagismo, bem como o número de itens fumados diariamente para fumantes e ex-fumantes. Alguns indivíduos desconheciam sua idade exata que, portanto, foi estimada.

4.4.2 Procedimentos clínicos

4.4.2.1 Teste de glicemia capilar plasmática (GCP) casual

O diagnóstico de Diabetes Mellitus foi avaliado pela determinação da GCP casual, em mg/dL utilizando-se o dispositivo Accu-Check (Accu-Chek Active, Roche[®], Brazil), baseando-se no critério diagnóstico descrito pelo “The Expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus” (2003). Em caso de indivíduos avaliados com GCP casual ≥ 200 mg/dL, foi realizada a repetição do teste de glicemia no dia seguinte, com o indivíduo em questão em jejum, para confirmação do diagnóstico, caso valores de GCP ≥ 126 mg/dL fossem encontrados (Corraini, 2007).

4.4.2.2 Exame clínico periodontal

Os exames clínicos foram realizados por um único examinador treinado e calibrado. Um auxiliar odontológico era responsável pela anotação dos dados em uma ficha (Anexo D), para melhor organização dos resultados obtidos. Todos os exames clínicos foram realizados sob condições de campo, isto é, nas residências dos participantes. Foram realizados durante o dia com o auxílio de uma lanterna tipo mineirador (Dark, Azteq[®], Brasil) fixada na cabeça do examinador, que serviu como fonte de iluminação. Para evitar cansaço excessivo do examinador, levando a variações na acuidade visual e no senso de tato (WHO, 1997), foram realizados no máximo 10 exames clínicos durante o dia.

Utilizando um espelho clínico plano (Espelho #5, Hu Friedy[®], Chicago, IL, EUA), e uma sonda milimetrada manual (PCPUNC - 15, Hu Friedy[®], Chicago, IL, EUA), os sulcos / bolsas foram examinados em 6 sítios por dente (faces méso-lingual, lingual, distolingual, méso-vestibular, vestibular e disto-vestibular) em todos os dentes permanentes, com exceção dos terceiros molares e os dentes em processo de erupção. Quantidades excessivas de cálculo que dificultassem um

correto registro dos parâmetros pela sonda foram removidas antes da sondagem, com auxílio de curetas (curetas Gracey 5/6, 11/12, 13/14, Hu Friedy®, Chicago, IL, EUA). Os seguintes parâmetros clínicos foram registrados:

1. Profundidade de sondagem (PS): distância (mm) compreendida entre a margem gengival e o fundo do sulco gengival ou da bolsa periodontal.
2. Linha esmalte-cimento à margem gengival (LEC-MG): distância (mm) que vai da linha esmalte-cimento à margem gengival. Se a LEC estivesse localizada coronalmente à margem gengival, o parâmetro receberia um valor negativo.
3. Nível clínico de inserção (NCI): é o valor correspondente à soma [$NCI = PS + (LEC-MG)$] dos valores de PS e LEC-MG.

Em dois sítios por dente (vestibular e lingual) os seguintes parâmetros clínicos subrogados também foram avaliados:

4. Índice de placa visível (Ainamo; Bay, 1975): foram considerados dentes com placa aqueles que apresentavam no mínimo um sítio com placa visível a olho nú. Sítios com ou sem placa visível foram classificados como 0 ou 1, respectivamente.
5. Ausência/Presença de cálculo supra-gengival: cálculo supra-gengival foi definido como depósitos calcificados localizados em uma coroa exposta e/ou superfícies radiculares que se estenderem em até 1 mm abaixo da margem gengival livre (Susin, 2004).

4.4.2.3 Exame microbiológico - coleta do biofilme subgengival

A coleta do biofilme subgengival foi realizada em 4 sítios por indivíduo após o exame clínico periodontal. Para esta finalidade, casos de doença periodontal destrutiva foram definidos como indivíduos que apresentaram no mínimo, um sítio com $PS \geq 4$ mm e $NCI \geq 4$ mm (Tomar; Asma, 2000). Em indivíduos identificados sem doença periodontal destrutiva, 1 sítio foi selecionado aleatoriamente por

quadrante. Nos casos, os 4 sítios foram selecionados de acordo com o seguinte critério:

1. De acordo com o exame clínico periodontal, os 4 sítios com as > PS em cada quadrante;
2. Havendo mais de 4 sítios que respeitassem esta condição, foram incluídos os sítios com > NCI.

Após remoção cuidadosa por meio de curetas periodontais estéreis (curetas Gracey 5/6, 11/12, 13/14, Hu Friedy®, Chicago, IL, EUA) do biofilme e/ou cálculo supra-gengival, quando presente, os dentes que preencheram o critério em questão foram isolados e secos com o auxílio de roletes de algodão. Executados estes procedimentos, quatro pontas de papel absorvente estéreis (#30, Tanari®, Manaus, AM, Brazil) foram inseridas no interior dos sulcos gengivais e/ou fundo das bolsas selecionados, e mantidos nos mesmos por, no mínimo, 10 s (Lau et al., 2004) (Figura 4.3)

Figura 4.3 – Exemplo de coleta do biofilme subgengival na população-alvo

Removidas, as pontas de papel absorvente foram então introduzidas em um mesmo tubo eppendorf vazio estéril de 1,5mL para análise por meio de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), armazenadas em um congelador presente nas localidades a - 10 °C, e transportadas em uma caixa térmica com gelo seco até o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Taubaté, onde foram armazenadas em um freezer com temperatura de - 80 °C até o momento da análise.

4.4.3 Procedimentos laboratoriais

A extração do DNA genômico foi realizada através do kit PureLink™ Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a realização deste procedimento, o material foi previamente homogeneizado em agitador mecânico (Vortex, Phoenix, AP56) por 60 s e 500 µL da amostra foram centrifugados por 3 min a uma velocidade de 12.000 rpm. Após remoção do sobrenadante, 180 µL de PureLink™ Genomic Digestion Buffer e 20 µL de Proteinase K foram adicionados ao pellet formado e cada minitubo foi incubado à 55 °C por 90 min. Após este procedimento, 20 µL de RNase A foram adicionados ao lisado. Esta solução foi agitada e incubada por 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer e 200 µL de etanol (100 %) foram adicionados e o minitubo agitado por 5 s, até a formação de uma solução homogênea.

Ao término deste processo, todo o lisado (~ 640 µL) foi transferido para um coluna (contendo membrana de sílica - “PureLink™ Spin Column”) acoplada a um tubo de coleção. E este conjunto foi centrifugado à 12.000 rpm, por 1 min. Em seguida, procederam-se duas lavagens da membrana com 500 µL de Wash Buffer 1 (12.000 rpm por 1 min) e Wash Buffer 2 (12.000 rpm por 3 min). Finalmente, 100 µL de PureLink™ Genomic Elution Buffer foi utilizado na eluição do DNA fixado na membrana de sílica.

O processo de extração foi confirmado pela técnica de PCR, como previamente descrito (Cortelli et al., 2008), utilizando-se iniciadores universais para a sequência 16S rDNA bacteriano. As amostras foram amplificadas utilizando-se iniciadores específicos para identificação de cepas bacterianas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a), *Porphyromonas gingivalis* (P.g), *Campylobacter rectus* (C.r), *Tannerella forsythia* (T.f) e *Prevotella intermedia* (P.i) (Quadro 4.1) (Ashimoto et al., 1996).

Micro-organismo	Sequencia 5'-3'	Produto esperado
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5'-ATGCCAACTTGACGTTAAAT-3' 5'-AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC-3'	557 pb
<i>P. intermedia</i>	5'-TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG-3' 5'-TCAACATCTCTGTATCCTGCGT-3'	575 pb
<i>P. gingivalis</i>	5'-AGGCAGCTTGCCATACTGCG-3' 5'-ACTGTTAGCAACTACCGATGT-3'	404 pb
<i>T. forsythia</i>	5'-GCGTATGTAACCTGCCCGCA-3' 5'-TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT-3'	641 pb
<i>C. rectus</i>	5'-TTTCGGAGCGTAACTCCTTTTC-3' 5'-TTTCTGCAAGCAGACACTCTT-3'	598 pb
Universal	5'-GATTAGATACCCTGGTAGTCCAC-3' 5'-CCCGGGAACGTATTACCG-3'	602 pb

Quadro 4.1 - Iniciadores utilizados no estudo para detecção de patógenos periodontais

Para a análise dos produtos amplificados pela PCR, foi empregada a eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, corados com SYBR Safe™ (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA). A eletroforese foi conduzida a 5 V/cm² em solução tamponada (TAE) por 120 min. A visualização dos produtos gerados pela amplificação pela PCR foi realizada em câmara de irradiação ultravioleta (UV). Marcador de peso molecular (Ladder 100, Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), bem como, controles positivos e negativos foram empregados em todos os géis, para a confirmação dos resultados obtidos pela PCR. Os géis foram fotografados (Figura 4.4) e comparados com os produtos.

Figura 4.4 - Fotografia do gel de agarose indicando os produtos de PCR primer - específico para o micro-organismo *C. Rectus*. 01 – Ladder 100pb, 02 – Controle positivo, 3-19 – Amostras, 21 – Controle negativo

Exclusivamente para as amostras positivas para o micro-organismo *A. actinomycetemcomitans*, foram realizados adicionalmente procedimentos de sorotipagem para os sorotipos reconhecidos a – f (Quadro 4.2), de acordo com as mesmas condições de PCR descritas por Teixeira et al. (2006). Controles positivos (sorotipo a: ATCC29523; sorotipo b: Y4; sorotipo c: NCTC9710; sorotipo d: IDH781; sorotipo e: IDH1705; e sorotipo f: CU1000) e negativos foram incluídos nas reações de PCR. Não foi observada amplificação nos controles negativos. Para avaliar a especificidade dos iniciadores utilizados no procedimento de sorotipagem, aproximadamente 10 % das amostras foram processadas em duplicata, 2 para cada sorotipo positivo, enquanto que os sorotipos não identificados nesse estudo (d e f), foram confirmados pelo sequenciamento do DNA das amostras de DNA extraídas dos controles positivos.

Iniciadores	Sequencia 5' - 3'	Produto esperado	Referencia
Sorotipo a	GCAATGATGTATTGTCTTCTTTTGGAC CTTCAGTTGAATGGGGATTGACTAAAAC	428 pb	Suzuki et al. 2001
Sorotipo b	CGGAAATGGAATGCTTGC CTGAGGAAGCCTAGCAAT	298 pb	Suzuki et al. 2001
Sorotipo c	AATGACTGCTGTCTCGGAGT CGCTGAAGGTAATGTCAG	559 pb	Suzuki et al. 2001
Sorotipo d	TTACCAGGTGTCTAGTCGGA GGCTCCTGACAACATTGGAT	690 pb	Suzuki et al. 2001
Sorotipo e	CGTAAGCAGAAGAATAGTAAACGT AATAACGATGGCACATCAGACTTT	211 pb	Suzuki et al. 2001
Sorotipo f	ARAAITTYTCWTCGGGAATG CCTTTATCAATCCAGACAGC	232 pb	Kaplan et al. 2001

Quadro 4.2 - Iniciadores utilizados para o procedimento de sorotipagem do *A.a*

Além disso, para detectar a presença da cepa altamente leucotóxica do *A. actinomycetemcomitans* (JP2), foi realizada a técnica de PCR no DNA extraído utilizando-se 2 iniciadores que amplificam a região promotora da leucotoxina (Brogan et al., 1994) – A – 5'-GCAGGATCCATATTAATCTCCTTGT-3' e B – 5'-GCGGTCGACAACCTGATAACAGTATT-3'. Esses iniciadores amplificam produtos de PCR de 492 pb ou 1022 pb, característicos das cepas altamente (JP2) e minimamente (não - JP2) leucotóxicas do *A. actinomycetemcomitans*, respectivamente.

4.5 AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DAS VARIÁVEIS

4.5.1 Entrevista por meio do questionário estruturado

As entrevistas foram treinadas previamente à realização do estudo, por meio de um pré-teste do questionário, realizado em 18 indivíduos residentes na cidade de Paraty, com escolaridade e CSE semelhantes às encontradas na população alvo. As entrevistas por meio do questionário estruturado foram então

aprimoradas quanto a uma linguagem mais adequada e permissiva. Das 24 questões inicialmente propostas, 3 foram eliminadas e uma foi modificada, devido à ausência de respostas confiáveis.

Alguns procedimentos de padronização foram empregados pelo entrevistador para garantir uma maior consistência dos dados obtidos. Dentre eles foram incluídos: exercício de uma atitude permissiva e amigável (Bowling, 2005), aderência à seqüência estabelecida de questões; e uniformidade na elaboração das perguntas (Schuman; Presser, 1981; Bowling et al., 1999; Susin, 2004).

Durante a realização do estudo, as entrevistas foram repetidas em 15 indivíduos (~ 7 % da população do estudo), 7 dias após a realização da primeira entrevista. O coeficiente *Kappa* (Hubert, 1977) para verificar a reprodutibilidade dos dados categóricos obtidos pelo questionário estruturado relacionados ao tabagismo, foi 0,86. Ele foi realizado, já que estudos prévios (Wagenknecht et al., 1992; Woodward; Tunstall-Pedoe, 1992; Patrick et al., 1994; Heller et al., 1998; Wells et al., 1998; Scott; Palmer; Stapleton, 2001; Spiekerman; Hujoel; DeRouen, 2003) revelaram que pode existir alta inconsistência dos dados obtidos com relação a esta variável, por meio de entrevista.

4.5.2 Exame clínico periodontal

Antes da realização e 4 meses após o início do estudo, o examinador foi calibrado para realizar o exame clínico, sob as mesmas condições em que realizou a mensuração dos parâmetros clínicos. A concordância intra-examinador tanto para NCI quanto PS foi avaliada por exames duplicados em quadrantes contralaterais de todos os dentes em 13 indivíduos da população no total (~ 6 % da população do estudo) escolhidos aleatoriamente. O exame era repetido 7 dias após o primeiro exame (Beck; Löe, 1993).

O coeficiente de correlação intra-classes (CCI) (Shrout; Fleiss, 1979) em nível de sítio variou entre 0,93 e 0,95 para NCI e entre 0,87 e 0,90 para PS, e em nível de indivíduo (valor médio) entre 0,98 e 0,99 tanto para NCI quanto PS. Para a extensão média de PS ≥ 4 mm, o CCI variou entre 0,88 e 1. O coeficiente K_w em nível de indivíduo para prevalência de NCI ≥ 5 mm e NCI ≥ 7 mm foi igual a 1.

4.5.3 GCP casual

Para avaliar a concordância dos resultados obtidos na determinação da GCP casual, o dispositivo Accu-Chek foi calibrado durante a realização do estudo por meio de re-exame em 13 indivíduos da população (~ 6 % da população de estudo), logo após a realização do primeiro exame. O coeficiente *Kappa* para verificar a reprodutibilidade dos dados categóricos obtidos pelo dispositivo em questão foi igual a 1.

4.5.4 Procedimentos laboratoriais

Para assegurar a reprodutibilidade dos procedimentos, 20 % das amostras positivas e negativas foram realizadas em duplicata.

4.6 ANÁLISE DE DADOS

4.6.1 Armazenamento dos dados

Durante a primeira fase do estudo (Corraini, 2007), os dados obtidos pelos exames clínicos e pelas entrevistas foram transformados em dados eletrônicos após a coleta em campo, por meio do programa Epidata 3.1 para Windows XP (Epidata Entry versão 3.1, Odense, Dinamarca). Os dados eletrônicos foram impressos e então comparados com os dados originais em papel, para correção de possíveis erros de digitação.

Após a finalização dos procedimentos laboratoriais, um novo formulário eletrônico foi criado por meio do programa Epidata, para a inclusão de 9 novas variáveis, que incluíram o número de identificação do tubo de eppendorf, a presença ou não de detecção de DNA bacteriano pela técnica de PCR, a presença / ausência

de cada um dos microrganismos estudados, distribuição dos sorotipos e presença do clone JP2 do *A.a*. Além disso, uma variável em comum com o primeiro formulário (número de identificação do indivíduo) foi também incluída, com a finalidade de unificar os dois formulários eletrônicos. Após a unificação, a base de dados final foi exportada para o programa Stata (Stata versão 10.0 para Windows, Stata Corporation, College Station, TX, EUA) por meio da extensão *.dta*.

4.6.2 Análise estatística

Após o armazenamento e exportação dos dados para o programa Stata, as relações entre os valores foram estudadas e descritas, para a descrição da distribuição e frequência das diferentes variáveis. Após esses procedimentos, as seguintes análises foram realizadas especificamente para cada um dos objetivos propostos:

4.6.2.1 Objetivos 1 e 2

A prevalência dos micro-organismos *A.a* (cepas minimamente e altamente leucotóxicas), *P.g*, *T.f*, *P.i* e *C.r* foi definida pela porcentagem de indivíduos que apresentaram a detecção positiva do microrganismo na amostra de biofilme subgengival. A sorotipagem do *A. actinomycetemcomitans* foi descrita para 6 dos 7 reconhecidos (Suzuki et al., 2001; Kaplan et al., 2001; Takada et al., 2010) sorotipos (a - f).

4.6.2.2 Objetivo 3

A co-ocorrência dos micro-organismos no biofilme subgengival foi avaliada por meio da geração de uma variável padrão no programa Stata, descrevendo a

presença simultânea das 5 espécies estudadas sendo que, a princípio, eram possíveis 2^5 diferentes padrões. A presença ou não, e a descrição de perfis bacterianos subgengivais dentre as 5 espécies analisadas foram então ilustradas por meio de árvore de decisão ou classificação (“decision trees”), realizada com o auxílio do programa SmartDraw 2010 para Windows. Nesta árvore, os ramos mais proximais compreenderam os microrganismos menos prevalentes e os ramos mais distais os microrganismos mais prevalentes, para evitar a presença de casas zero. A identificação dos perfis subgengivais foi realizada por meio da observação da distribuição de probabilidades de cada um dos ramos da árvore de decisão gerada.

4.6.2.3 Objetivo 4

A acurácia diagnóstica dos perfis bacterianos subgengivais, previamente identificados pelo objetivo 3, foi primeiramente avaliada por meio do cálculo da porcentagem do erro de classificação total, sensibilidade e especificidade, utilizando o Stata. Devido à ausência de um critério uniforme para a definição de doenças periodontais destrutivas (referência padrão), os seis seguintes desfechos sub-rogados foram considerados: prevalência (definida como a presença de pelo menos um sítio apresentando a condição) e extensão (definida como a presença de pelo menos 30% dos sítios apresentando a condição) de $\text{NCI} \geq 5 \text{ mm}$, $\text{NCI} \geq 7 \text{ mm}$ e $\text{PS} \geq 5 \text{ mm}$.

Além disso, para avaliar a habilidade da detecção dos microrganismos estudados no biofilme subgengival como marcadores diagnósticos adjuntos à informação obtida pelo clínico (Guggermoos-Holzmann; Van Houwelingen, 2000), foram realizadas uma série de modelos preditivos baseados em árvores de decisão ou classificação, com o auxílio do programa DTREG para Windows (Phillip H. Sherrod, Tennessee, EUA) para os os desfechos descritos acima, em duas situações distintas:

- Cenário 1 – Informação anamnética + micro-organismos no biofilme subgengival: presença dos 5 microorganismos estudados, idade (12-19 / 20-

29 / 30-39 / 40-49 / 50+), gênero (masculino / feminino), tabagismo (fumantes e ex-fumantes / não-fumantes), e diabetes (sim / não).

- Cenário 2: Marcadores diagnósticos clínicos tradicionais, isto é, informação anamnética + avaliação clínica de placa e cálculo supragengival: idade (12-19 / 20-29 / 30-39 / 40-49 / 50+), gênero (masculino / feminino), tabagismo (fumantes e ex-fumantes / não-fumantes), diabetes (sim / não), % de sítios com placa visível (< 75 / ≥ 75), e % de sítios com cálculo supragengival (< 20 / 20-50 / > 50).

No modelo de predição por meio de árvores de decisão, cada árvore é construída primeiramente por meio de uma ramificação binária do desfecho em questão (neste caso os 6 desfechos surrogados previamente descritos) em dois “filhos” ou “nós-filhos”. O mesmo procedimento, chamado de particionamento recursivo (Breiman, 1984), é então realizado para dividir os nós-filhos, e a árvore resultante deste particionamento pode ser utilizada para prever o status do desfecho estudado. Para cada particionamento, o software escolhe qual melhor variável utilizar para a divisão de ramos e quais categorias ou conjunto de categorias da variável preditora formarão cada um dos nós-filhos resultantes. A princípio, o software é capaz de gerar árvores tão extensas que 1 indivíduo pode constituir um nó-filho terminal, então o programa é adaptado para que a árvore seja limitada por número máximo de níveis e/ou número de indivíduos mínimo para cada nó-filho. A Figura 4.5 representa um exemplo de um output gráfico de uma árvore de decisão utilizando o cenário 1 na predição de indivíduos apresentando pelo menos um sítio com CAL ≥ 5 mm, permitindo no máximo 3 níveis.

Para a presente análise, foi permitido um limite máximo de até 4 níveis para cada árvore gerada pelo programa. Baseado em cada uma das árvores foi calculado então para cada cenário a % de misclassificação total, bem como para casos e não-casos, de acordo com os desfechos estudados. Os valores para cada cenário foram então comparados por meio do teste χ^2 , utilizando um nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$).

Figura 4.5 - Exemplo de output realizado pelo software DTREG para uma árvore de decisão com o número máximo de 3 níveis permitido para prever o desfecho prevalência de CAL $\geq$ 5 mm, por meio das variáveis incluídas no cenário 1

4.6.2.4 Objetivo 5

Para explorar e quantificar a associação entre parâmetros clínicos periodontais (variáveis dependentes) e a perfis microbianos subgengivais específicos nesta população, foram realizadas uma série de análises de regressão logística múltipla (Hosmer; Lemeshow, 2000).

As variáveis dependentes consideradas foram: prevalência de NCI ≥ 5 mm e 7 mm, PS ≥ 4 mm e ≥ 5 mm.

As variáveis independentes ou preditores candidatos considerados para inclusão na análise de regressão logística incluíram:

- Idade (12-19 / 20-29 / 30-39 / 40+ anos)
- Gênero (Masculino / Feminino)
- Presença de renda monetária (sim / não)
- Escolaridade (< 4 anos / ≥ 4 anos)
- Analfabetismo (sim / não)
- Recebeu tratamento urgencial? (sim / não)
- Diabetes (sim / não)
- Tabagismo: Fumante ou ex-fumante (sim / não)
- % sítios com placa visível (< 75 / ≥ 75)
- % sítios com cálculo supragengival (< 20 / 20-50 / > 50)
- Presença de um dos 7 perfis microbianos específicos (sim / não).

Os perfis microbianos subgengivais específicos incluíram a presença de:

- *A. actinomycetemcomitans* (sim / não)
- *P. gingivalis* (sim / não)
- *T. forsythia* (sim / não)
- *P. intermedia* (sim / não)
- *C. rectus* (sim / não)

- pelo menos um dos reconhecidos periodontopatógenos (Consensus report, 1996; Papapanou, 2002) (sim / não), isto é, *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*
- co-ocorrência de *P. gingivalis* e *T. forsythia* (sim / não), baseado no perfil 2 identificados pelo objetivo 3.

Primeiramente, todas as variáveis independentes associadas com os desfechos descritos a $p < 0,25$, verificado por meio do teste de Wald na análise de regressão univariada, foram incluídos nos modelos múltiplos (Hosmer; Lemeshow, 2000).

Com relação às variáveis independentes % de sítios apresentando cálculo supragengival e placa visível (possíveis variáveis de confusão), apenas a variável % de sítios com cálculo supragengival foi selecionada nas análises de regressão múltipla, com a finalidade de evitar colinearidade (Szklo; Javier Neto, 2007), já que as mesmas apresentam alta correlação.

Em se tratando das variáveis independentes microbiológicas (exposição de interesse), cada um dos perfis em questão associados com os desfechos descritos na regressão univariada foram modelados separadamente em uma sequência de diferentes modelos múltiplos. Modelos múltiplos finais nos quais as variáveis independentes microbiológicas foram excluídos não foram descritos, já que representam grandes similaridades com resultados prévios (Corraini et al., 2008a,b). As variáveis foram removidas do modelo um a um, até o teste de razão log-likelihood (Hosmer; Lemeshow, 2000) indicar que mais nenhuma variável pôde ser removida. Uma variável foi considerada fator de confusão se sua remoção do modelo multivariável significou em mudanças maiores do que 10 % no coeficiente β (Maldonado; Greenland, 1993). Interações biologicamente plausíveis foram avaliadas. O intervalo de confiança (IC) aplicado foi de 95%.

No entanto, ao avaliar a possibilidade de utilizar os perfis microbianos subgengivais como indicadores de risco por meio da modelagem estatística múltipla, deve ser levado em consideração o fato das variáveis independentes microbiológicas avaliadas fazerem parte do biofilme subgengival, isto é, serem componentes do biofilme supra e subgengival, representado pela variável independente quantidade de cálculo supragengival (informação clínica). Assim, existe a possibilidade de os mesmos estarem atuando como mediadores na

associação, ou fatores associados intermediários (Kraemer et al., 2001; Pearce; Merletti, 2006), ou mesmo sinérgicos (Darroch, 1997) nas associações previamente encontradas entre a % de sítios com cálculo gengival e os desfechos periodontais aumento de PS e NCI moderada e severa (Corraini, 2007; Corraini et al., 2008).

Levando em consideração essa prerrogativa, as seguintes abordagens analíticas foram testadas e descritas nas modelagens múltiplas:

- Abordagem # 1: Biofilme como mediador ou fator intermediário na associação: A dose-resposta do efeito e o efeito de uma variável sobre a outra foi comparada entre as duas variáveis independentes nos mesmos modelos múltiplos
- Abordagem # 2: Para as variáveis independentes microbiológicas que permaneceram nos modelos finais múltiplos na abordagem #1, o efeito das mesmas foi comparado quando substituídas pela variável % de sítios apresentando cálculo subgengival nos modelos múltiplos previamente realizados (Corraini, 2007; Corraini et al., 2008a,b)
- Abordagem # 3: O efeito das variáveis independentes microbiológicas que permaneceram nos modelos finais múltiplos na abordagem #1 foi comparado por meio da análise estratificada pela variável % de sítios apresentando cálculo subgengival, controlada ou não pela variável independente tabagismo (utilizando os comandos *tabmore* e *effects* por meio do programa Stata).

5 RESULTADOS

Do total de 195 indivíduos dentados e, portanto, elegíveis para os objetivos do presente estudo, 170 receberam coleta do biofilme subgengival. A Tabela 5.1 descreve os parâmetros demográficos, biológicos, comportamentais e clínicos periodontais da população final de estudo. Não houve diferença significativa entre os indivíduos que permitiram (n = 170) ou não (n = 25) a coleta do biofilme subgengival.

Tabela 5.1 - Parâmetros demográficos, biológicos, comportamentais e clínicos dos indivíduos que permitiram (n = 170) ou não (n = 25) a coleta do biofilme subgengival

Parâmetro	Categorias	Com coleta	Sem coleta	p*
		microbiológica (n = 170)	microbiológica (n = 25)	
Faixa etária, % ≥ 30 anos		47,7	52,0	0,68
Gênero, % masculino		54,7	48,0	0,53
Analfabetismo, %		30,6	24,0	0,50
Fumantes ou ex-fumantes		36,5%	48,0%	0,27
<i>Diabetes mellitus</i>		1,2%	0%	0,59
% Indivíduos receberam tratamento urgencial		60,0%	68,0%	0,44
Média (DP) dentes presentes		20,9 (7,2)	19,6 (8,9)	0,41
% sítios	20-50%	34,1%	36,0%	0,85
Cálculo supragengival	> 50%	29,4%	36,0%	0,50
Prevalência de NCI	≥ 5mm	54,1%	48,0%	0,57
	≥ 7mm	27,7%	36,0%	0,39
Extensão de NCI†	≥ 5mm	11,5%	21,2%	0,17
	≥ 7mm	4,9%	7,0%	0,66
Prevalência de PS ≥ 5mm		36,5%	36,0%	0,96
Extensão de PS ≥ 5mm†		2,7%	3,9%	0,74

*Teste qui-quadrado para diferença entre proporções entre duas amostras e teste T de Student para diferença entre médias; † Extensão foi definida como a porcentagem de sítios por indivíduo apresentando uma determinada condição

Em todas as amostras de biofilme subgingival foi detectada a presença de DNA bacteriano por meio da técnica do PCR. Em sete indivíduos (4 %), nenhum dos micro-organismos estudados foi detectado.

Com relação a cada um dos objetivos específicos propostos:

5.1 OBJETIVO 1

A. actinomycetemcomitans foi detectado em 25% dos indivíduos (variando de 27,8% entre indivíduos de 12-19 anos até 19,2 % em indivíduos com mais de 50 anos), enquanto que *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* e *C. rectus* foram detectados em 64%, 59%, 38% e 90% dos indivíduos, respectivamente. A prevalência dos micro-organismos *P. gingivalis* e *T. forsythia* foi definida por um gradiente positivo de idade (Figura 5.1), sendo que o aumento da idade contribuiu para uma maior prevalência destes micro-organismos, que variou de 33,3% a 84,6% e de 36,1% a 80,8% para *T. forsythia* e *P. gingivalis*, respectivamente. O micro-organismo *C. rectus* foi observado em 86,1%, 84,9%, 91,4%, 100% e 96,2% dos indivíduos, nos grupos etários de 12-19, 20-29, 30-39, 40-49 e 50 ou mais anos de idade, respectivamente.

Figura 5.1 - Prevalência dos 5 micro-organismos estudados de acordo com a idade

5.2 OBJETIVO 2

Entre as amostras positivas para o *A.a* ($n = 42$), 18 (41,5%) representaram o sorotipo *a*, 2 (4,9%) o sorotipo *b*, 19 (46,3%) o sorotipo *c*, 1 (2,4%) o sorotipo *e*, e 4 (9,8%) foram não-sorotipáveis. Os sorotipos *d* e *f* não foram detectados em nenhum indivíduo. O sorotipo *b*, foi encontrado em apenas 2 indivíduos, sendo que os mesmos pertenciam à mesma família. Dois indivíduos apresentaram sorotipagem mista, que constituiu dos sorotipos *a* e *c*. A cepa altamente leucotóxica (clone JP2) do *A. actinomycetemcomitans* (encontrada em indivíduos do sorotipo *b*) não foi detectada em nenhum indivíduo desta população.

5.3 OBJETIVO 3

Com relação à identificação de possíveis perfis microbianos subgengivais, a espécie *C. rectus* foi excluída devido a sua presença em aproximadamente 100% dos indivíduos (91%). Dentre as possíveis combinações entre as 4 espécies remanescentes, foi possível observar uma frequência de probabilidades maior nos ramos que continham: (perfil 1) nenhum dos micro-organismos ($n = 31$), e; (perfil 2) nos ramos que continham os micro-organismos *P. gingivalis* e *T. forsythia* ($n = 77$) (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Árvore de decisão para os micro-organismos *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* na população-alvo

5.4 OBJETIVO 4

A tabela 4 descreve o erro de classificação total, e os valores de sensibilidade e especificidade dos dois perfis microbianos subgengivais dominantes no diagnóstico dos desfechos periodontais subrogados descritos. O perfil 1 demonstrou valores de sensibilidade extremamente baixos, indicando que todos os 4 micro-organismos estavam raramente ausentes quando a doença estava presente, e valores moderados de especificidade, resultando em um erro de classificação variando entre 21,2 % (extensão de PS $\geq$ 5 mm) e 65,3 % (prevalência de NCI $\geq$ 5 mm). O Perfil 2 apresentou valores de sensibilidade variados (0 a 100%) na identificação dos desfechos sub-rogados periodontais avaliados, e valores de baixos a moderados para a especificidade (variando de 54,4 % a 76,9 %). O erro de classificação total variou de 28,8 % a 43,5 %, sendo este mais alto para os dois desfechos mais raros (extensão de NCI $\geq$ 7 mm e PS $\geq$ 5 mm).

A Tabela 5 descreve os resultados das árvores de decisão para os dois cenários de predição, o cenário 1, utilizando a informação microbiológica como adjunta; ou o cenário 2, utilizando os preditores clínicos tradicionais no diagnóstico de indivíduos com prevalência ou extensão de NCI $\geq$ 5 mm. Os micro-organismos que foram relacionados a uma melhora na acurácia diagnóstica foram a *T. forsythia* (quando empregado o limite máximo de 2, 3 ou 4 níveis permitidos para a construção da árvore), *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* e *P. gingivalis* (limite de 3 e 4 para níveis máximos permitidos para a construção da árvore). No cenário 1, não foi verificada melhora na classificação de indivíduos com extensão de NCI $\geq$ 5 mm, em comparação com o cenário 2, até que uma árvore de mais de 2 níveis fosse construída. Esta foi baseada nos preditores idade e *T. forsythia*, enquanto que uma árvore de 4 níveis apresentou a melhor predição na identificação de indivíduos apresentando pelo menos um sítio com NCI $\geq$ 5 mm. A melhor classificação de casos foi obtida utilizando os preditores do cenário 1 ($p < 0,01$), enquanto que a melhor classificação de não-casos foi melhor obtida utilizando os preditores do cenário 2 ($p < 0,01$). No entanto, o erro de classificação total foi similar nos 2 cenários.

Tabela 5.2 – Erro de classificação total, sensibilidade e especificidade dos dois perfis microbianos subgengivais no diagnóstico de indivíduos de acordo com os 6 desfechos periodontais. Prevalência foi definida como a presença de pelo menos um sítio com a condição, e extensão como presença de pelo menos 30 % dos sítios afetados

		Perfil 1			Perfil 2		
Desfecho		Erro	Sensibilidade	Especificidade	Erro	Sensibilidade	Especificidade
NCI	Prevalência	65,3 %	6,5 %	67,9 %	30,0 %	64,1 %	76,9 %
≥ 5 mm	Extensão	41,2 %	0 %	81,5 %	31,8 %	50,0 %	54,8 %
NCI	Prevalência	44,7 %	2,1 %	75,6 %	27,1 %	83,0 %	69,1 %
≥ 7 mm	Extensão	31,8 %	0 %	81,7 %	35,3 %	0 %	54,4 %
PS	Prevalência	52,3 %	3,2 %	73,1 %	28,8 %	72,6 %	70,4 %
≥ 5 mm	Extensão	21,2 %	0 %	81,7 %	43,5 %	100 %	55,0 %

Tabela 5.3 - Dados demográficos, clínicos e comportamentais com (Cenário 1) ou sem (Cenário 2) o auxílio da informação fornecida pelo exame microbiológico no diagnóstico de indivíduos com prevalência e extensão de NCI ≥ 5 mm (todos os preditores candidatos estão descritos em ordem decrescente de importância)

N Máx níveis	Cenário 1	NCI ≥ 5 mm	% Erro classificação			Cenário 2	NCI ≥ 5 mm	% Erro classificação		
			Total	Não - casos	Casos			Total	Não - Casos	Casos
1	Idade*	Prevalência	21,8	16,7	26,1	Idade*	Prevalência	21,8	16,7	26,1
		Extensão	10,0	8,5	14,6		Extensão	10,0	8,5	14,6
2	Idade*, <i>Tf</i> , T	Prevalência	21,8	16,7 [†]	26,1	Idade, P, CS	Prevalência	20,0	9,0	29,3
	Idade*, <i>T.f</i>	Extensão	8,8	4,7	22,0	Idade, CS	Extensão	8,8	3,9	24,4
3	Idade*, <i>Tf</i> , T, G	Prevalência	17,1	26,9 [†]	8,7 [†]	Idade, CS, P	Prevalência	18,2	15,4	20,7
	Idade*, <i>T.f</i> , T, <i>C.r</i>	Extensão	8,8	4,7	22,0	Idade, CS, T, P, G	Extensão	7,6	4,6	17,0
4	Idade*, <i>Tf</i> , T, G, <i>A.a</i> , <i>C.r</i> , <i>P.g</i>	Prevalência	16,5	26,9 [†]	7,6 [†]	Idade, CS, P, T, G	Prevalência	17,6	10,3	23,9
	Idade*, <i>T.f</i> , T, <i>C.r</i> , G	Extensão	8,8	4,7	22,0	Idade, CS, T, P, G	Extensão	7,6	2,3	24,4

*Idade foi analisada de acordo com as categorias 12-19, 20-29 e 30+ anos; [†] $p \leq 0.01$ para a hipótese nula = % erro de classificação dos cenários 1 e 2 são iguais; T = tabagismo; G = gênero; P = % de sítios por indivíduo com biofilme dental visível; CS = % de sítios por indivíduo com cálculo supragengival.

A Figura 4.5 ilustra a árvore de decisão correspondendo ao máximo de 3 níveis permitidos para o cenário 1 (Tabela 5.3). Nesta árvore, a ausência de *T. forsythia* no biofilme subgengival em indivíduos < 30 anos foi associada com a ausência de NCI ≥ 5 mm (erro de classificação igual a zero); enquanto que indivíduos fumantes ou ex-fumantes com 30 ou mais anos de idade foram associados com a presença de NCI ≥ 5 mm (erro de classificação igual a zero).

Para os desfechos subrogados extensão de NCI ≥ 7 mm e PS ≥ 5 mm, não foi possível realizar análises por meio árvores de decisão, devido à presença de número relativamente baixo de indivíduos apresentando as condições. Com relação ao cenário 1, o único micro-organismo que foi utilizado pelo software para prever o desfecho prevalência de NCI ≥ 7 mm foi a *T. forsythia*. Da mesma maneira que com a prevalência de NCI ≥ 5 mm, não houve redução significativa ($p = 0,421$) no erro de classificação total quando foram comparados os preditores do cenário 1 (9,4 % utilizando idade, *T. forsythia*, tabagismo e gênero) com os do cenário 2 (10 % utilizando informação sobre a idade, tabagismo, gênero, % sítios com cálculo subgengival, e % de sítios com biofilme dental visível), permitindo um máximo de 4 níveis na árvore. No entanto, os preditores do cenário 1 (idade e *T. forsythia*) foram estatisticamente superiores ($p = 0,02$) em classificar corretamente casos (erro de classificação = 27,7 %) em comparação ao cenário 2 (idade, tabagismo e % sítios com cálculo subgengival) (erro de classificação = 36,2 %).

A tabela 5.4 representa os resultados das árvores de decisão para indivíduos com prevalência de PS ≥ 5 mm. Entre os preditores microbiológicos, *T. forsythia* foi novamente o mais importante, seguido pela *P. intermedia* e o *C. rectus*. A inclusão de preditores microbiológicos resultou em uma melhor classificação de casos ($p \leq 0,01$), porém, pior com relação aos não-casos ($p < 0,01$) em comparação com os preditores do cenário 2. O erro de classificação total não foi diferente quando preditores foram escolhidos dos cenários 1 ou 2 ($p = 0,08 - 1$).

Tabela 5.4 - Dados demográficos, clínicos e comportamentais com (Cenário 1) ou sem (Cenário 2) o auxílio da informação fornecida pelo exame microbiológico no diagnóstico de indivíduos com pelo menos um sítio apresentando PS $\geq$ 5 mm (todos os preditores candidatos estão descritos em ordem decrescente de importância)

N máx níveis	Cenário 1	% Erro classificação			Cenário 2	% Erro classificação		
		Total	Não - casos	Casos		Total	Não - Casos	Casos
1	<i>T.f</i>	31,2	41,7 [†]	12,9 [†]	CS	25,3	17,6	38,7
2	<i>T.f</i> , idade*, <i>P.i</i>	25,3	31,5 [†]	14,5 [†]	CS, idade	25,3	17,6	38,7
3	<i>T.f</i> , idade, T, <i>P.i</i>	24,1	33,3 [†]	8,1 [†]	CS, idade, P, G	25,3	17,6	38,7
4	<i>T.f</i> , idade, T, <i>P.i</i> , <i>C.r</i>	21,8	20,4	24,2 [†]	CS, idade, P, T, G	22,9	16,7	33,9

[†] $p \leq 0.01$ para a hipótese nula = % erro de classificação dos cenários 1 e 2 são iguais; T = tabagismo; G = gênero; P = % sítios com biofilme dental visível; CS = % sítios com cálculo supragengival. *Idade foi categorizada em 12-19, 20-29 e 30 + anos.

5.5 OBJETIVO 5

A Tabela 5.5 descreve a análise de regressão logística univariada da associação entre cada uma das variáveis dependentes consideradas (prevalência de NCI ≥ 5 mm e ≥ 7 mm e PS ≥ 5 mm) e as variáveis independentes microbiológicas. De acordo com esta análise, as seguintes variáveis foram consideradas na inclusão dos modelos múltiplos: presença de *P.g*, *T.f*, *P.i*, pelo menos um dos reconhecidos periodontopatógenos e o perfil 2 para NCI e PS ≥ 5 mm e a inclusão do *C.r* para NCI ≥ 7 mm. Para PS ≥ 4 mm o *A.a* também foi incluído.

Tabela 5.5 - Análises de regressão logística univariada entre as variáveis dependentes prevalência de NCI ≥ 5 mm, NCI ≥ 7 mm e PS ≥ 5 mm e as variáveis independentes microbiológicas

Variável independente	NCI ≥ 5 mm		NCI ≥ 7 mm		PS ≥ 5 mm	
	OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
<i>A.a</i>	1,1	[0,6;2,3]	0,8	[0,4;1,8]	1,1	[0,6;2,4]
<i>P.g</i>	3,0*	[1,5;5,7]	4,7*	[1,9;11,3]	3,2*	[1,5;6,5]
<i>T.f</i>	7,7*	[3,8;15,4]	27,4*	[6,4;118,1]	10,8*	[4,5;26,0]
<i>P.i</i>	2,3*	[1,2;4,4]	2,2*	[1,1;4,4]	2,3*	[1,2;4,5]
<i>C.r</i>	1,6	[0,6;4,4]	2,9*	[0,6;13,4]	1,8	[0,6;5,9]
<i>A.a / P.g / T.f</i>	6,8*	[2,8;16,7]	17,6*	[2,3;132,5]	9,9*	[3,0;57,2]
<i>T.f + P.g</i>	6,3*	[3,2;12,3]	10,5*	[4,5;24,6]	6,0*	[3,0;12,0]

* $p < 0,25$

De acordo com a abordagem analítica #1 para a modelagem múltipla, considerando a inclusão da % de sítios com cálculo supragengival nos modelos juntamente com os perfis microbianos subgengivais em questão (Tabelas 5.6 e 5.8), os seguintes perfis microbiológicos subgengivais estiveram positivamente associados com a prevalência de NCI: nenhum perfil subgengival para NCI ≥ 5 mm, e a presença de *T.f* (OR = 25,0; IC 95% = 3,9-158,5), a co-ocorrência de *P.g* + *T.f* (OR = 4,1; IC = 1,1-14,6), e a presença de *P.g* (OR = 4,1; IC 95% = 1,1-14,6). Com relação ao aumento na PS, o mesmo foi observado para os seguintes perfis:

presença de *T.f* (OR = 5,1; IC 95% = 2,0-13,0), a presença de no mínimo um dos 3 reconhecidos periodontopatógenos (OR = 4,3, IC 95% = 1,4-12,7), e a co-ocorrência de *P.g* + *T.f* (OR = 3,7, IC 95% = 1,6-8,4).

De acordo com a abordagem analítica #2 (Tabelas 5.7 e 5.9), com relação ao desfecho prevalência de NCI $\geq$ 5 mm, apenas os modelos que apresentaram *T.f* nos perfis subgengivais foram superiores aos modelos apresentando quantidade de cálculo supragengival como variável independente (OR_{*T.f*} = 4,2 (IC 95% = 1,8 – 9,8), OR_{*A.a/P.g/T.f*} = 3,1 (IC 95% = 1,0 – 9,4), e OR_{*P.g + T.f*} = 2,9 (IC 95% = 1,2 – 6,8) versus cálculo supragengival OR_{20-50%} = 2,9 (IC 95% = 1,1-7,6)). Porém, eles somente foram superiores quando comparados às categorias entre 20—50% dos sítios, sendo que, quando indivíduos apresentavam mais que 50% dos sítios com a condição, os marcadores microbiológicos não foram superiores (OR_{>50%} = 10,6 (IC 95 % = 2,5 – 44,8). Já nos casos mais graves, isto é, prevalência de NCI $\geq$ 7 mm, os mesmos marcadores foram superiores à todas as categorias da variável independente % sítios com cálculo supragengival (OR_{*T.f*} = 23,2 (IC 95% = 4,1 – 132,0), OR_{*A.a/P.g/T.f*} = 11,1 (IC 95% = 1,1 – 111,0), e OR_{*P.g + T.f*} = 10,9 (IC 95% = 3,2 – 37,2). Os resultados descritos para PS $\geq$ 5 mm foram similares aos observados para prevalência de NCI $\geq$ 7 mm (Tabela 5.9).

Tabela 5.6 - Análises de regressão logística múltipla entre as variáveis dependentes prevalência de NCI ≥ 5 mm, NCI ≥ 7 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, de acordo com a abordagem #1 (inclusão de % de sítios com cálculo supragengival nos modelos)

Variável independente		NCI ≥ 5 mm			NCI ≥ 7 mm				
		Modelo 1 [‡] OR [95% CI]	Modelo 2 [§] OR [95% CI]	Modelo 3 OR [95% CI]	Modelo 1 [‡] OR [95% CI]	Modelo 2 [§] OR [95% CI]	Modelo 3 OR [95% CI]	Modelo 4 [¶] OR [95% CI]	Modelo 5 [#] OR [95% CI]
Faixa etária (anos)	12-19	<i>ref</i>	<i>Ref</i>	<i>Ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	20-29	3,7 [0,9;15,5]	3,4 [0,9;14,0]	3,4 [0,8;14,0]	0,4 [0,1;3,4]	0,5 [0,1;3,4]	0,5 [0,1;3,8]	0,5 [0,1;3,4]	0,6 [0,1;4,3]
	30-39	8,3 [1,8;38,3] [†]	8,3 [1,8;38,1] [†]	8,1 [1,8;37,1] [†]	0,7 [0,1;5,4]	0,9 [0,1;6,0]	0,9 [0,1;6,4]	0,8 [0,1;6,3]	1,4 [0,2;9,9]
	40+	17,0 [2,7;109,1] [†]	18,9 [3,0;120,6] [†]	17,4 [2,7;111,4] [†]	8,3 [1,1;61,8]*	8,6 [1,2;59,5]*	13,4 [2,2;81,7] [†]	7,8 [1,0;58,0]*	13,7 [2,0;95,6] [†]
Tabagismo	Não	<i>ref</i>	<i>Ref</i>	<i>Ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	Sim	2,7 [1,0;7,4]	2,9 [1,1;7,6]*	2,8 [1,0;7,4]*	6,0 [2,0;18,6] [†]	6,0 [2,1;17,1] [†]	7,3 [2,4;21,8] [†]	7,1 [2,4;20,4] [†]	6,2 [2,2;17,4] [†]
Presença do perfil microbiano ?	Não	<i>ref</i>	<i>Ref</i>	<i>Ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	Sim	2,4 [1,0;6,1]	1,4 [0,5;4,5]	1,7 [0,7;4,3]	25,0 [3,9;158,5] [†]	10,0 [0,9;114,6]	9,4 [2,8;31,1] [†]	4,1 [1,1;14,6]*	1,9 [0,7;5,4]
% Sítios Cálculo Supragengival	< 20%	<i>ref</i>	<i>Ref</i>	<i>Ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	-	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	20-50%	3,3 [1,2;8,8]*	3,6 [1,4;9,7] [†]	3,3 [1,2;9,0]*	0,9 [0,2;4,5]	1,3 [0,3;5,7]	-	1,4 [0,3;6,5]	1,4 [0,3;6,3]
	> 50%	13,7 [3,0;62,5] [†]	16,0 [3,6;71,8] [†]	14,9 [3,3;67,2] [†]	2,5 [0,5;13,6]	2,8 [0,6;13,9]	-	3,2 [0,6;16,7]	2,6 [0,5;13,3]
Hosmer-Lemeshow		Chi ² = 6,13	Chi ² = 3,65	Chi ² = 7,87	Chi ² = 11,91	Chi ² = 11,81	Chi ² = 8,02	Chi ² = 10,06	Chi ² = 12,89
Goodness-of-fit test		gl = 7 <i>p</i> = 0,52	gl = 7 <i>p</i> = 0,82	gl = 7 <i>p</i> = 0,34	gl = 7 <i>p</i> = 0,10	gl = 7 <i>p</i> = 0,11	gl = 7 <i>p</i> = 0,33	gl = 7 <i>p</i> = 0,19	gl = 8 <i>p</i> = 0,12
Área sob a curva ROC		0,91	0,91	0,91	0,94	0,91	0,93	0,92	0,91

* $p \leq 0,05$; [†] $p \leq 0,01$; [‡]Modelo 1: Presença de *T.f.*; [§]Modelo 2: Presença de, no mínimo, um dos seguintes periodontopatógenos: *A.a/P.g/T.f.*; ^{||}Modelo 3: Presença de *P.g* + *T.f.*; [¶]Modelo 4: Presença de *P.g.*; [#]Modelo 5: Presença de *P.i.*

Tabela 5.7 - Análises de regressão logística múltipla entre as variáveis dependentes prevalência de NCI ≥ 5 mm, NCI ≥ 7 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, de acordo com a abordagem #2 (exclusão de % de sítios com cálculo supragengival nos modelos)

Modelo apresentando variável independente		NCI ≥ 5 mm			NCI ≥ 7 mm				
		<i>T.f</i> OR [95% CI]	<i>A.a</i> / <i>P.g</i> / <i>T.f</i> OR [95% CI]	<i>P.g</i> + <i>T.f</i> OR [95% CI]	<i>T.f</i> OR [95% CI]	<i>A.a</i> / <i>P.g</i> / <i>T.f</i> OR [95% CI]	<i>P.g</i> + <i>T.f</i> OR [95% CI]	<i>P.g</i> OR [95% CI]	<i>P.i</i> OR [95% CI]
%	< 20%	<i>ref</i>	<i>Ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
Sítios	20-50 %		2,9 [1,1;7,6]*				1,3 [0,3;6,0]		
Cálculo supragengival	> 50%		10,6 [2,5;44,8] [†]				4,1 [0,8;21,4]		
Presença do perfil microbiano ?	Não	<i>ref</i>	<i>Ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	Sim	4,2 [1,8;9,8] [†]	3,1 [1,0;9,4]*	2,9 [1,2;6,8]*	23,2 [4,1;132,0] [†]	10,1 [1,0;98,1]*	9,1 [2,8;28,9] [†]	4,3 [1,3;14,7]*	2,6 [0,9;7,2]

* $p \leq 0.05$; [†] $p \leq 0.01$

Tabela 5.8 - Análises de regressão logística múltipla entre a variável dependente prevalência de PS $\geq$ 5 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, de acordo com a abordagem n.1 (inclusão de % de sítios com cálculo supragengival nos modelos)

Preditor	Categorias	PS $\geq$ 5 mm			
		Modelo 1 [‡] OR [IC 95%]	Modelo 2 [§] OR [IC 95%]	Modelo 3 OR [IC 95%]	Modelo 4 [¶] OR [IC 95%]
Faixa etária (anos)	12-19	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	20-29	5,6 [1,1;29,1]*	5,8 [1,1;30,3]*	5,3 [1,0;27,7]*	5,0 [1,0;25,5]
	30-39	3,2 [0,6;17,9]	3,3 [0,6;18,2]	2,8 [0,5;16,3]	2,9 [0,5;17,0]
	40+	7,3 [1,3;42,0]*	8,9 [1,5;51,9]*	7,4 [1,2;43,5]*	8,1 [1,4;47,4]*
Gênero	Masculino	-	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	Feminino	-	0,5 [0,2;1,0]	0,4 [0,2;0,9]*	0,4 [0,2;0,9]*
Presença do microrganismo?	Não	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	Sim	5,1 [2,0;13,0] [†]	4,6 [1,2;17,9]*	3,7 [1,6;8,4] [†]	2,2 [0,9;5,4]
% Sítios Cálculo Supragengival	<20%	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	20-50%	3,4 [1,1;10,3]*	4,3 [1,4;12,7] [†]	3,4 [1,1;10,2]*	4,2 [1,4;12,5] [†]
	>50%	5,6 [1,6;19,5] [†]	6,5 [1,9;22,3] [†]	5,7 [1,6;19,8] [†]	7,1 [2,1;24,3] [†]
Hosmer-Lemeshow		Chi ² = 2,77	Chi ² = 2,33	Chi ² = 5,47	Chi ² = 8,86
Goodness-of-fit test		gl = 6 <i>p</i> = 0,84	gl = 7 <i>p</i> = 0,94	gl = 8 <i>p</i> = 0,71	gl = 8 <i>p</i> = 0,35
Área sob a curva ROC		0,84	0,82	0,84	0,82

* $p \leq 0.05$; [†] $p \leq 0.01$; [‡]Modelo 1: Presença de *T.f.*; [§]Modelo 2: Presença de, no mínimo, um dos seguintes periodontopatógenos: *A.a* / *P.g* / *T.f.*; ^{||}Modelo 3: Presença de *P.g* + *T.f.*; [¶]Modelo 4: Presença de *P.g*

Tabela 5.9 - Análises de regressão logística múltipla entre a variável dependente prevalência de PS $\geq$ 5 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, de acordo com a abordagem #2 (exclusão de % de sítios com cálculo supragengival nos modelos)

Modelo apresentando variável independente	Categorias	PS $\geq$ 5 mm			
		<i>T.f</i> OR [IC 95%]	<i>A.a</i> / <i>P.g</i> / <i>T.f</i> OR [IC 95%]	<i>P.g</i> + <i>T.f</i> OR [IC 95%]	<i>P.g</i> OR [IC 95%]
% Sítios Cálculo supragengival	< 20 %	<i>ref</i>			
	20-50 %	4,4 [1,5;12,8] [†]			
	> 50 %	7,4 [2,2;24,8] [†]			
Presença do microrganismo?	Não	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>	<i>ref</i>
	Sim	8,0 [3,1;20,5] [†]	9,1 [2,0;42,3] [†]	4,5 [2,0;9,9] [†]	2,5 [1,1;5,8] [*]

* $p \leq 0.05$; [†] $p \leq 0.01$

De acordo com a abordagem #3 (Tabela 5.10), foi possível verificar a presença de algumas das categorias da estratificação apresentando valores iguais a zero para os desfechos menos freqüentes, isto é, prevalência de NCI $\geq$ 7 mm e PS $\geq$ 5 mm. Houve uma tendência para uma maior chance de risco em excesso para o perfil apresentando *T.f* em sua composição (OR = 4,7, IC 95% = 1,1-20,0, nos indivíduos apresentando < 20 % dos sítios com cálculo supragengival). No entanto, essa tendência não foi estatisticamente significativa ($p = 0,94$), após o controle para a variável de confusão tabagismo. Além disso, ela só foi verificada para o desfecho prevalência de NCI $\geq$ 5 mm. Para a maioria das outras variáveis independentes microbiológicas, a tendência entre os diferentes estratos de cálculo supragengival foi oposta, porém não significativa.

Tabela 5.10 – Distribuição dos perfis microbianos subgengivais com relação à diferentes categorias de presença de cálculo supragengival, e análises de regressão logística múltipla entre as variáveis dependentes prevalência de NCI ≥ 5 mm, ≥ 7 mm e PS ≥ 5 mm, e as variáveis independentes microbiológicas, estratificada por % de sítios apresentando cálculo supragengival, e controlada pela variável independente tabagismo. (abordagem #3)

Perfil microbiano subgengival	NCI ≥ 5 mm			NCI ≥ 7 mm			PS ≥ 5 mm		
	% sítios cálculo supragengival			% sítios cálculo supragengival			% sítios cálculo supragengival		
	< 20	20 – 50	> 50	< 20	20 – 50	> 50	< 20	20 – 50	> 50
$T.f = 0$, N (%) [*]	43 (9,3)	18 (38,9)	8 (87,5)	43 (2,3)	18 (0)	8 (12,5)	43 (4,7)	18 (16,7)	8 (25,0)
$T.f = 1$, N (%) [*]	19 (31,6)	40 (70,0)	41 (95,1)	19 (15,8)	40 (32,5)	41 (70,7)	19 (21,1)	40 (52,5)	41 (73,2)
OR _{$T.f$} [IC 95%] [†]	4,7 [1,1;20,0]	3,1 [0,9;10,5]	2,3 [0,2;30,6]	9,0 [0,8;102,5]	-	22,0 [2,1;228,2]	5,5 [0,9;33,1]	5,0 [1,2;20,2]	7,7 [1,3;45,0]
$T.f + P.g = 0$, N (%) [*]	52 (15,4)	25 (44,0)	15 (86,7)	52 (3,9)	25 (4,0)	15 (33,3)	52 (9,6)	25 (20)	15 (46,7)
$T.f + P.g = 1$, N (%) [*]	10 (20,0)	33 (72,7)	34 (97,1)	10 (20,0)	33 (36,4)	34 (73,5)	10 (10)	33 (57,6)	34 (73,5)
OR _{$T.f+P.g$} [IC 95%] [†]	1,3 [0,2;7,4]	2,8 [0,9;8,9]	5,7 [0,5;70,8]	6,5 [0,7;62,8]	12,0 [1,3;111,0]	10,6 [2,3;49,3]	1,0 [0,1;9,6]	4,8 [1,4;16,3]	3,4 [0,9;12,3]
$A.a/P.g/T.f = 0$, N (%)	25 (8,0)	8 (37,5)	2 (100)	25 (4,0)	8 (0)	2 (0)	25 (4)	8 (12,5)	2 (0)
$A.a/P.g/T.f = 1$, N (%)	37 (21,6)	50 (64,0)	48 (93,8)	37 (8,1)	50 (26,0)	48 (62,5)	37 (13,5)	50 (46)	48 (66,7)
OR _{$A.a/P.g/T.f$} [IC 95%] [†]	3,5 [0,7;19,1]	2,7 [0,5;13,8]	-	2,4 [0,2;26,9]	-	-	3,9 [0,4;35,5]	5,6 [0,6;49,9]	-
$P.g = 0$, N (%)	35 (17,1)	17 (47,1)	10 (90,0)	35 (5,7)	17 (5,9)	10 (40)	35 (11,4)	17 (23,5)	10 (50)
$P.g = 1$, N (%)	27 (14,8)	41 (65,9)	39 (94,9)	27 (7,4)	41 (29,3)	39 (66,7)	27 (7,4)	41 (48,8)	39 (69,2)
OR _{$P.g$} [IC 95%] [†]	0,8 [0,2;3,4]	2,0 [0,6;6,8]	3,0 [0,2;38,8]	1,3 [0,2;11,4]	7,2 [0,8;67,3]	7,0 [1,4;35,3]	0,6 [0,1;3,7]	3,0 [0,8;10,9]	2,8 [0,7;11,9]

^{*} Número de indivíduos em cada categoria e porcentagem de indivíduos de cada categoria apresentando o desfecho de interesse.

[†] Análise de Mantel-hantzel, testando hipótese na qual os ORs entre os estratos de % de sítios apresentando cálculo supragengival são diferentes, $^{\ddagger}p \leq 0,05$

6 DISCUSSÃO

Para facilitar a leitura, a discussão foi dividida de acordo com os 5 objetivos propostos, consecutivamente; sendo que os objetivos 1 e 2 foram descritos em conjunto.

6.1 OBJETIVOS 1 E 2

6.1.1 *A. actinomycetemcomitans*

Este micro-organismo foi encontrado em aproximadamente 25% das amostras de biofilme subgengival. Com exceção de uma população indígena na Guatemala (Dowsett et al., 2002), no qual a espécie não foi encontrada em nenhum indivíduo utilizando a técnica de checkerboard DNA-DNA hybridization, a prevalência do *A. actinomycetemcomitans* nesta população foi baixa em comparação com a grande maioria dos estudos epidemiológicos realizados em populações periodontalmente não-tratadas. Dahlen et al. (2002) encontrou uma prevalência de 88% entre indivíduos tailandeses utilizando cultura e um meio seletivo (TSBV). Estimativas de prevalência altas também foram encontradas na China (83,1%, Papapanou et al., 1997) e África (cerca de 60%, Haubek et al., 2001), utilizando a técnica de checkerboard DNA-DNA hybridization e cultura, respectivamente. Timmerman et al. (1998) e Van der Velden et al. (2006) relataram prevalências em torno de 36% e 55%, respectivamente, entre adolescentes na Indonésia, utilizando a técnica de imunofluorescência. De maneira interessante, apresentou-se similar às relatadas em populações caucasianas (geralmente em torno de 20%) em amostras de biofilme subgengival (Haubek et al., 1995; Fine et al., 2007; Rylev; Killian, 2008) e de saliva (Könönen et al., 2007) utilizando as técnicas PCR e sequenciamento, respectivamente. Com relação à técnica laboratorial empregada, o PCR primer-específico é reconhecido como uma técnica altamente específica e sensível tanto para a avaliação da presença do *A.*

actinomycescomitans quanto na detecção dos sorotipos e do clone JP2 deste micro-organismo (Poulsen et al., 2003; Elamin et al., 2011).

A prevalência deste micro-organismo não foi definida por um gradiente positivo de idade, e este foi o único micro-organismo estudado que apresentou sua maior prevalência no grupo etário mais jovem (12-19 anos de idade), o que pode indicar uma colonização nos estágios iniciais da doença, já que a mesma possui uma relação direta com a idade.

Os padrões subgengivais de distribuição dos sorotipos do *A. actinomycescomitans* podem variar em populações de diferentes etnias e/ou raças (Pinheiro et al., 2011). De acordo com estudos prévios, os sorotipos *a* e *c* ocorrem com maior frequência entre as amostras bucais (Dahlén et al., 2002; Kaplan et al., 2002; Fine et al., 2007), o que também ocorreu nesta população, no qual eles representaram aproximadamente 90% das amostras positivas para o *A.a*. No entanto, em uma população similar de adolescentes na Indonésia o sorotipo *b* foi detectado em predominância (54%, Van der Reijden et al., 2008), o que foi observado nesta população em apenas dois indivíduos pertencentes à mesma família (irmãos), o que é consistente com a transmissão intra-familiar anteriormente relatada para o *A.a* (Haraszthy et al., 2000). Além disso, 2 dos 42 indivíduos positivos para o *A. actinomycescomitans* foram colonizados por dois sorotipos diferentes ao mesmo tempo, confirmando que a sorotipagem mista é rara entre indivíduos portadores deste micro-organismo no ambiente subgengival (Haubek et al., 1995). A cepa altamente leucotóxica do *A.a* não foi detectada em nenhum indivíduo desta população. A população-alvo consistiu de indivíduos cossanguíneos com descendência caipara, que constitui-se principalmente de uma mistura das populações indígenas e dos colonizadores portugueses, e de maneira mais distante da etnia africana, que foi inserida nessa população por meio dos escravos africanos que trabalhavam nas fazendas de café durante o século XIX, o que pode ter contribuído para os resultados encontrados referente a este clone (Rylev; Kilian, 2008).

6.1.2 *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *C. rectus* e *T. forsythia*

Devido à escassez de estudos epidemiológicos realizados avaliando os outros 4 micro-organismos estudados, as comparações nas estimativas de prevalência foram descritas em conjunto. A prevalência do periodontopatógeno *P. gingivalis* foi similar em comparação a algumas populações não-tratadas, porém mais baixa quando comparada às mesmas que utilizaram o checkboard DNA-DNA hybridization como técnica laboratorial. Em uma amostra de 255 adolescentes na Indonésia, 63 a 87% dos indivíduos foram detectados com o micro-organismo utilizando cultura e imunofluorescência indireta (Timmerman et al., 1998, 2000, 2001; Van der Velden et al., 2006; Van Winkelhoff et al., 2008). Já na Tailândia e na China, o mesmo micro-organismo foi encontrado em grande predominância dos adultos, isto é, 99,7 % e 100 % dos indivíduos (Papapanou et al., 1997, 2002), respectivamente. O mesmo aconteceu para os micro-organismos *P.i*, *C.r* e *T.f*. As prevalências dos micro-organismos *P.g*, *T.f* e *C.r* apresentaram gradiente positivo de idade, o que também foi observado para o *P.g* em amostras de saliva de uma população adulta na Finlândia (Könönen et al., 2007).

6.2 OBJETIVO 3

Os resultados do presente estudo revelaram que perfis microbianos subgengivais específicos puderam ser identificados nesta população isolada brasileira. Dois perfis foram encontrados entre os 5 micro-organismos estudados: o perfil 1, que consistiu na ausência de todos os microrganismos estudados, com exceção da freqüente presença do *C. rectus*; e o perfil 2, que consistiu da co-ocorrência das espécies *T. forsythia* e *P. gingivalis*.

A co-ocorrência de *T. forsythia* e *P. gingivalis* (Perfil 2) é descrita como um fato freqüente (Socransky; Hafajee, 1998; Ezzo; Cutler, 2003), fato que também levou à descrição do complexo vermelho por Socransky e Hafajee (1998). Alguns estudos hipotetizam que *T. forsythia* pode preceder *P. gingivalis* na formação do biofilme subgengival, o que é enfatizado em estudos avaliando casos de gengivite

(predominância de *T. forsythia*) e gravidade de doenças periodontais destrutivas (predominância de *P. gingivalis*) (Tanner et al., 1998; Ezzo; Cutler, 2003). Outros possíveis mecanismos que podem explicar essa possível colonização mútua incluem as altas propriedades de adesão (co-agregação ou co-adesão) do *P. gingivalis* aos colonizadores iniciais e tardios do biofilme subgengival (Yao et al., 1996; Kolenbrander et al., 2002).

6.3 OBJETIVO 4

Alguns estudos clínicos (Ashimoto et al., 1996; Paster et al., 2001; Loomer, 2004; Byrne et al., 2009) e poucos estudos epidemiológicos (Papapanou et al., 1997, 2002; Deng et al., 2011) têm mostrado a presença de micro-organismos distintos no ambiente subgengival de indivíduos saudáveis e doentes do ponto de vista periodontal. No entanto, não existem estudos, tanto clínicos como epidemiológicos até o momento, avaliando como diferentes combinações de espécies podem atuar como marcadores no diagnóstico de diferentes estados de saúde ou doença periodontal.

No presente estudo, o perfil 1, envolvendo a ausência de todos os micro-organismos estudados com exceção do *C. rectus*, foi raramente identificado nos casos, sejam eles definidos pela prevalência ou extensão de NCI ≥ 5 mm, ≥ 7 mm ou PS ≥ 5 mm; isto é, a sensibilidade foi próxima a zero. Este achado está de acordo com estudos clínicos avaliando a microbiota periodontal na manutenção da saúde na fase de controle e manutenção periodontal (Dahlén et al., 1998; Tomasi et al., 2006). A especificidade foi relativamente alta, indicando que a presença de um ou mais dos 4 micro-organismos que definiram o perfil foram detectados freqüentemente entre os não-casos, sejam eles definidos por cada um dos 6 desfechos estudados.

Por outro lado, o perfil 2, foi capaz de classificar corretamente casos com NCI ou PS com moderada especificidade e sensibilidade, confirmando resultados de um recente estudo clínico longitudinal avaliando periodontopatógenos como preditores na progressão da periodontite crônica (Byrne et al., 2009), e de um estudo prospectivo de 10 anos em uma população rural chinesa (Papapanou et al.,

1997). Porém, os resultados relacionados à extensão de $\text{NCI} \geq 7 \text{ mm}$ e $\text{PS} \geq 5 \text{ mm}$ devem ser observados com cautela, já que existiam poucos indivíduos nessa população apresentando essas condições.

Os resultados de acurácia diagnóstica descritos para os perfis 1 e 2, utilizando o indivíduo como unidade de análise, mostraram que a simples detecção de micro-organismos periodontais no biofilme subgengival foi capaz de discriminar indivíduos de acordo com o status periodontal, mesmo sem a realização de técnicas de quantificação. Esses resultados entram em desacordo com a visão amplamente aceita de que é necessária a quantificação da carga microbiana no biofilme subgengival para distinguir estados de saúde e doença periodontal (Papapanou et al., 1997; Papapanou, 2002). Entretanto, a discriminação obtida pelos micro-organismos atuando como únicos marcadores no diagnóstico das doenças periodontais destrutivas esteve associada ao alto erro de classificação total (variando de 20 a 65 %, aproximadamente), erro este similar aos observados com relação à análise discriminativa descrita numa população rural na China (Papapanou et al., 1997); e que ainda previne o seu uso individual para o objetivo diagnóstico.

Em se tratando de doenças de etiologia multifatorial, na qual testes laboratoriais definitivos são inexistentes, clínicos utilizam uma combinação de informações, obtidas pela anamnese e pelo exame clínico, na realização do diagnóstico diferencial (D'Ercole et al., 2008; Streiner; Norman, 2008; Xiang et al., 2010). Esta informação (co-variáveis) deve ser levada em consideração quando resultados de estudos utilizando marcadores microbiológicos são avaliados (Shaddox; Walker, 2009), já que esta informação também influencia a interpretação de sinais, sintomas e resultados de testes laboratoriais (Guggernmoos-Holzmann; Van Houwelingen, 2000). Portanto, um dos objetivos desse estudo foi investigar também a importância do diagnóstico microbiológico relativa à informação que pode ser obtida por um exame clínico de rotina. De acordo com este objetivo, a análise por meio de árvores de decisão ou classificação foi introduzida como um possível novo caminho ou meio útil para modelar estatisticamente os dados complexos referentes aos micro-organismos periodontais em relação ao status periodontal. Árvores de decisão são freqüentemente utilizadas como uma ferramenta importante na construção de árvores filogenéticas (Paster et al., 2001), e mais recentemente, como análise estatística auxiliar na modelagem da informação diagnóstica médica (Fadlalla et al., 2010; Worachartcheewan et al., 2010).

Quando adjuntos à informação obtida pela anamnese, os marcadores microbiológicos puderam contribuir para uma melhor classificação de indivíduos de acordo com o estado periodontal. Isso foi verificado pelos menores erros de classificação obtidos entre os casos. Entretanto, os não-casos foram identificados com maior precisão por meio da informação obtida pela anamnese e os marcadores clínicos tradicionais. Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre o erro de classificação total dos cenários 1 e 2 para todos os desfechos estudados.

Apesar dos resultados obtidos, a real utilidade clínica destes marcadores diagnósticos microbiológicos ainda permanece especulativa, já que para serem introduzidos, é necessário que eles mudem também a categoria de classificação diagnóstica e, portanto, o plano de tratamento periodontal; ou resultem em superioridade no tratamento; ou possuam maior custo-benefício (Listgarten; Loomer, 2003; D'Ercole et al., 2008). Além disso, quando considerada nesta perspectiva, ainda deve ser lembrado que os indicadores diagnósticos parecem ser dependentes da prevalência e extensão das doenças periodontais destrutivas na população em questão (Guggenmoos-Holzmann; Van Houwelingen, 2000). Com relação ao possível melhor custo-benefício, o preço dos testes microbiológicos disponíveis comercialmente ainda não justifica o seu uso. No entanto, se empregados, os resultados encontrados indicaram que a abordagem mais econômica seria testar apenas para a espécie *T. forsythia*, já que esta se ressaltou como o melhor candidato entre os cinco micro-organismos estudados na identificação de indivíduos com prevalência e extensão de PS e NCI. Uma possível explicação para este achado neste estudo pode estar relacionada a uma maior detecção deste micro-organismo em indivíduos doentes do ponto de vista periodontal (Loomer, 2004) pela técnica do PCR, em comparação com a cultura e outras técnicas laboratoriais, sendo que a maioria dos estudos prévios baseou-se em técnicas outras que não o PCR (cultura ou checkeaboard).

6.4 OBJETIVO 5

Ao investigar a associação entre determinados perfis microbianos subgengivais e parâmetros clínicos periodontais nessa população, foram realizadas três abordagens de estratégia estatística nas análises de regressão logística múltipla. Cada uma delas contribuiu de alguma maneira para um melhor entendimento da relação entre a exposição de interesse e os desfechos estudados.

Com relação à primeira abordagem, foi observado que os seguintes perfis subgengivais estiveram associados com a prevalência de perda clínica de inserção nos modelos finais de regressão logística múltipla, ajustados para variáveis demográficas, biológicas e comportamentais: *T. forsythia* (NCI ≥ 5 mm e ≥ 7 mm), *P. gingivalis* (NCI ≥ 7 mm) e a co-ocorrência destes 2 micro-organismos (NCI ≥ 7 mm). Ainda, foi possível observar que os seguintes perfis subgengivais estiveram associados ao aumento da PS: presença de *T.f*, pelo menos um dos três reconhecidos periodontopatógenos (*A.a*, *P.g*, *T.f*) e a co-ocorrência *T.f* + *P.g*. Estes resultados podem indicar que, tanto para casos de perda de inserção periodontal quanto para aumento na profundidade de sondagem, o micro-organismo *T. forsythia* foi o marcador de risco mais consistente nas associações encontradas. No entanto, quando associado ao *P. gingivalis* (perfil 2), a associação foi mais precisa (intervalo de confiança mais estreito). Ainda, os únicos modelos múltiplos nos quais a dose-resposta do efeito (OR) nos mesmos modelos apresentou-se maior (OR médio), em comparação com o maior efeito entre as categorias de % de sítios apresentando cálculo supra-gengival, foram os que continham o *T. forsythia* em sua composição (modelo 1 para prevalência de NCI ≥ 7 mm e PS ≥ 5 mm, e modelos 3 e 4 para > 50% dos sítios apresentando cálculo supra-gengival e prevalência de NCI ≥ 7 mm).

De acordo com as duas abordagens adicionais com relação às análises anteriores testadas, quando comparado o efeito entre os modelos múltiplos que continham variáveis independentes clínicas representando o biofilme supragengival como indicadores de risco (% de sítios apresentando placa e cálculo), com o efeito nos modelos múltiplos que continham variáveis independentes microbiológicas (Perfis microbianos subgengivais), novamente foi verificado que a tendência na superioridade entre presença de *T.f* nos perfis subgengivais e a quantidade de cálculo supragengival como variável independente. Para o desfecho prevalência de

NCI $\geq$ 5 mm, eles apresentarem-se superiores somente quando comparados às categorias entre 20—50% dos sítios, sendo que, quando indivíduos apresentavam mais que 50% dos sítios com a condição, os marcadores microbiológicos não foram superiores. Já nos casos mais graves, isto é, prevalência de NCI $\geq$ 7 mm e PS $\geq$ 5 mm, os mesmos marcadores foram superiores à todas as categorias da variável independente de comparação (% sítios com cálculo supragengival). Esses resultados poderiam indicar que: 1) provavelmente os marcadores microbiológicos são mais importantes como indicadores de risco na ausência de sinais clínicos evidentes de presença de cálculo supragengival, perdendo assim sua importância em indivíduos com piores condições de higiene bucal, e 2) provavelmente eles estão mais associados ao desfecho nos casos mais graves por ser em consequência de parte do processo de doença (aumento na PS).

Estas duas últimas afirmações foram também investigadas durante a abordagem #3, no qual a estratégia de estratificar a análise múltipla pela variável % de sítios com cálculo supragengival foi realizada. Ela foi controlada apenas pela variável tabagismo, já que a maioria das outras variáveis de confusão (principalmente a idade) se comportou da mesma maneira em todos os outros modelos. De acordo com esta análise, o único marcador microbiológico que demonstrou uma tendência à maior importância como indicador de risco na ausência de sinais clínicos evidentes de presença de cálculo supragengival foi o perfil contendo o micro-organismo *T.f.*, verificado pela maior chance de risco em excesso com relação ao desfecho prevalência de NCI $\geq$ 5 mm. No entanto, isso não foi verificado para nenhum outro perfil, o que limita a interpretação deste resultado. De fato, a maior tendência foi para uma maior dose-resposta do efeito quanto maior a % de sítios apresentando cálculo supragengival, indicando que sim eles podem ser consequência de parte do processo das doenças periodontais. No entanto, o seu efeito como mediador na associação entre % de sítios com cálculo e os desfechos estudados também não foi evidenciado, já que a diferença entre as associações verificadas entre os estratos não foi significativa.

Ao comparar os resultados dessas análises com os outros poucos estudos epidemiológicos realizados, é importante ressaltar que nenhum dos estudos utilizou a mesma técnica de coleta microbiológica ou laboratorial, nem realizou a mesma abordagem analítica. Grossi et al. (1994), em um estudo transversal incluindo uma amostra de 1426 indivíduos representativa de um condado de Nova

York, encontrou resultados similares a este estudo, utilizando a técnica laboratorial de imunofluorescência e similar abordagem analítica de regressão logística múltipla, porém assumindo independência entre as variáveis independentes microbiológicas. Papapanou et al. (1997), em um estudo epidemiológico longitudinal envolvendo amostras microbiológicas em 148 indivíduos de uma amostra representativa de uma população rural na China, encontrou associação significativa entre a colonização subgengival excedendo um determinado limite de detecção e a presença de aumento da PS para os micro-organismos *P. gingivalis* (OR = 5,1, IC 95% = 2,5 - 10,5), *T. forsythia* (OR = 5,0, IC 95% = 2,5 - 10,2), *C. rectus* (OR = 2,7, IC 95% = 2,2 - 9,0), e *T. denticola* (OR = 2,8, IC 95% = 1,7 - 6,8), utilizando a técnica laboratorial do checkboard e análise de regressão logística univariada. Em um estudo transversal realizado pelo mesmo grupo na Tailândia (Papapanou et al., 2002), os mesmos limites de detecção excedidos para as mesmas espécies previamente estudadas no estudo da China representaram uma associação significativa entre a presença de aumento da PS para a *T. forsythia*, *F. nucleatus*, *P. micros*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. intermedius*, e *T. denticola*.

Apesar da alta prevalência de perda clínica de inserção e aumento da PS tanto em indivíduos jovens como adultos desta população (~ 10 % na prevalência de Periodontite Agressiva no grupo etário de 12-29 anos de idade, e > 50 % na prevalência de NCI $\geq$ 5 mm e 7 mm nos indivíduos adultos; Corraini et al., 2008a, 2009), ela não pôde ser explicada tanto pela presença dos clone altamente como minimamente leucotóxico do A.a, o que foi evidenciado pela similar ocorrência deste micro-organismo entre indivíduos com ou sem presença de aumento no NCI, PS e % de sítios apresentando cálculo supragengival, e pela ausência de associação significativa nos modelos múltiplos de regressão logística (Tabelas 5.6 e 5.8).

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vantagens com relação ao presente estudo incluem o desenho populacional tanto para a determinação da prevalência dos micro-organismos estudados (Epidemiologia Descritiva), quanto para a avaliação de risco (Epidemiologia Analítica) e acurácia diagnóstica (Epidemiologia Clínica). A

representabilidade das amostras microbiológicas em relação à população alvo, a inclusão tanto de indivíduos saudáveis e doentes do ponto de vista periodontal, a utilização do indivíduo como unidade de análise, além da possibilidade de avaliar uma população isolada também foram pontos fortes deste estudo. A técnica laboratorial utilizada no processamento das amostras (PCR) apresenta alta especificidade e sensibilidade para todos os micro-organismos analisados (Sakamoto et al., 2005; D'Ercole et al., 2008), e é também recomendada para o uso em estudos epidemiológicos avaliando doenças bucais (Deng et al., 2011).

Limitações deste estudo incluem a utilização do desenho transversal na avaliação de risco e do valor diagnóstico dos perfis microbianos subgengivais estudados, já que modelos preditivos e causais são idealmente baseados em dados originados em estudos de coorte, no qual a exposição deve sempre preceder o desfecho (Hill, 1965). No entanto, as modelagens utilizadas para as análises por meio de árvores de decisão ou classificação, e para o estudo de associação são idealmente realizadas em uma base de dados inicial, geralmente gerada por dados de estudos transversais, seguidos por uma subsequente validação do modelo no follow-up e por diferentes bases de dados ou populações.

No entanto, para responder às questões geradas por este estudo, não somente são necessários estudos que levem a temporalidade em conta, bem como consistência por meio de estudo em outras populações. Ainda, são necessários estudos envolvendo a interdisciplinaridade para entender, por exemplo, a flutuação na presença e quantidade de micro-organismos específicos no ambiente subgengival com o tempo, bem como entender os mecanismos envolvidos no processo de formação, desenvolvimento, co-agregação, e patogenicidade da complexa ecologia microbiana existente no biofilme periodontal e patogenicidade destes micro-organismos “*in vitro*” e “*in vivo*”. Enquanto novas técnicas e conhecimento emergem dentro do campo da microbiologia e da periodontia, mais é conhecido a respeito da microbiota associada com as doenças periodontais. No entanto, apesar dos grandes avanços, o entendimento da complexa ecologia microbiana parece estar só no começo (Marsh et al., 2011).

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados por este estudo, podemos concluir que:

- 1) Os micro-organismos periodontais estudados foram prevalentes nessa população isolada;
- 2) Esta população apresentou predominância dos sorotipos a e c do *A. actinomycetemcomitans*. A cepa altamente leucotóxica deste micro-organismo (clone JP2) não foi detectada em nenhum indivíduo desta população;
- 3) Perfis microbianos subgengivais puderam ser identificados nesta população isolada.
- 4) Os perfis microbianos subgengivais identificados não foram superiores quanto ao diagnóstico de parâmetros clínicos periodontais específicos, quando adicionados à informação clínica tradicional.
- 5) Perfis microbianos subgengivais incluindo *T. forsythia* como indicador de risco foram significativamente associados com o aumento da PS e do NCI nessa população isolada.

REFERÊNCIAS¹

Abdellatif HM, Burt BA. An epidemiological investigation into the relative importance of age and oral hygiene status as determinants of periodontitis. J Dent Res. 1987;66:13-8.

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

Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. J Periodontol. 1999;70:13-29.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 1996; 11: 266-73.

Baelum V. The epidemiology of destructive periodontal disease: causes, paradigms, problems, methods and empirical evidence [Doctorate Thesis]. Aarhus: Royal Dental College, Faculty of Dentistry, University of Aarhus; 1998.

Baelum V, Lopez R. Periodontal epidemiology: towards social science or molecular biology? Community Dent Oral Epidemiol. 2004;32:239-49.

Beck JD, Löe H. Epidemiological principles in studying periodontal diseases. Periodontol 2000. 1993;2:34-45.

Breiman L. Classification and Regression Trees. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC; 1984.

Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Dermuth DR. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. Infection and Immunity. 1994; 62:501-08.

Bowling A. Mode of questionnaire administration can have serious effects on data quality. J Public Health. 2005;27:281-91.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bowling A, Bond M, Jenkinson C, Lamping D. Short form-36 (SF-36) health survey questionnaire: which normative data should be used? Comparisons between the norms provided by the Omnibus survey in Britain. The health survey for England and the Oxford health and lifestyle survey. *J Public Health Med.* 1999;21:255-70.

Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24:469-77.

Consensus report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 926-32.

Contreras A, Rusitanonta T, Chen C, Wagner WG, Michalowicz BS, Slots J. Frequency of 530-bp deletion in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin promoter region. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15: 338-40.

Corraini P. Perda de inserção periodontal em uma população isolada brasileira: prevalência, extensão, severidade e indicadores de risco [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2007.

Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Periodontal attachment loss in an untreated isolated population of Brazil. *J Periodontol.* 2008_a; 79: 610-20.

Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Risk indicators for increased probing depth in an isolated population in Brazil. *J Periodontol.* 2008_b; 79: 1726-34.

Corraini P, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Risk indicators for aggressive periodontitis in an isolated population in Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23:209-15.

Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Fernandes CB, de Carvalho-Filho, Franco GC, et al. Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1322-9.

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

Dahlén G. Microbiological diagnosis in oral diseases. *Acta Odontol Scand*. 2006; 64: 164-68.

Dahlén G, Rosling B. Identification of bacterial markers by culture technique in evaluation of periodontal therapy. *Int Dent J*. 1998;48:104-10.

Dahlén G, Widar F, Teanpaisan R, Papapanou PN, Baelum V, Fejerskov O. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a rural adult population in southern Thailand. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17:137-42.

Darroch J. Biologic synergism and parallelism. *Am J Epidemiol*. 1997;145:661-8.

Deng T, Wang L, Lv J, Pang J, Liu B, Du Y, et al. Association of three bacterial species and periodontal status in Chinese adults: an epidemiological approach. *J Clin Microbiol*. 2011;49:184-8.

D'Ercole S, Catamo G, Piccolomini R. Diagnosis in Periodontology: A further aid through microbiological tests. *Crit Rev Microbiol*. 2008; 34:33-41.

Dhingra K, Vandana KL. Prophylactic vaccination against periodontal disease: A systematic review of preclinical studies. *J Periodontol*. 2010;81:1529-46.

Dowsett SA, Kowolik MJ, Archila LA, Eckert GJ, LeBlanc DJ. Subgingival microbiota of indigenous Indians of Central America. *J Clin Periodontol*. 2002;29:159–67.

Elamin A, Albandar JM, Poulsen K, Ali RW, Bakken V. Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Sudanese patients with aggressive periodontitis: a case-control study. *J Periodont Res*. 2011;46:285-91.

Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2003; 32:24-35.

Fadlalla AM, Golob JF, Claridge JA. Enhancing the Fever Workup Utilizing a Multi-Technique Modeling Approach to Diagnose Infections More Accurately. *Surg Infect (Larchmt)*. 2010; ahead of print.

Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. J Clin Microbiol. 2007;45:3859-69.

Fletcher RH, Fletcher SW. Clinical epidemiology: the essentials. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

Greenland S, Brumback B. An overview of relations among causal modeling methods. Int J Epidemiol. 2002; 31: 1030-7.

Grossi SG, Zambom JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol. 1994;65:260-7.

Guggenmoos-Holzmänn I, Van Houwelingen HC. The (in)validity of sensitivity and specificity. Stat Med. 2000;19:1783-92.

Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. Periodontol 2000. 2006;42:7-12.
. J Periodontol. 2008;79: 144-9.

Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EMB, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, et al. Evidence for the role of highly leucotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. J Periodontol. 2000; 71: 912-22.

Haubek D, Poulsen K, Asikainen S, Kilian M. Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Microbiol. 1995;33:395-401.

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

Haubek D, Ennibi O-K, Poulsen K, Benzarti N, Baelum V. The highly leucotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and progression of periodontal attachment loss. J Dent Res. 2004; 83: 767-70.

Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Vaeth M, Poulsen S, Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescents carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: A prospective longitudinal cohort study. *Lancet*. 2008;371:237-42.

Heitz-Mayfield LJA. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(Suppl. 6):196–209.

Heller W-D, Scherer G, Sennewald E, Adlkofer F. Misclassification of smoking in a followup population in southern Germany. *J Clin Epidemiol*. 1998;51:211-8.

Hernán MA, Hernández-Díaz S, Werler MM, Mitchell AA. Causal knowledge as prerequisite for confounding evaluation: An application to birth defects epidemiology. *Am J Epidemiol*. 2002; 155:176-84.

Hill AB. The environment and disease: association or causation? *Proc R Soc Med*. 1965; 58: 295-300.

Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. New York: John Wiley & Sons; 2000.

Hubert L. Kappa revisited. *Psychol Bull*. 1977;84:289-97.

Kaplan JB, Perry MB, Maclean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun*. 2001;69:5375-84.

Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D, Fine DH. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1181-7.

Kinney JS, Morelli T, Braun T, Ramseier CA, Herr AE, Sugai JV, et al. Saliva / pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *J Dent Res*. 2011;90:752-8.

Koch R. Die aetiologie der tuberkulose. *Mitt Kais Gesundheitsamt*. 1884;2:1-88.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, England PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66:486-505.

Könönen E, Paju S, Pussinen PJ, Hyvönen M, Di Tella P, Suominen-Taipale L et al. Population-based study of salivary carriage of periodontal pathogens in adults. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2446-51.

Kraemer HC, Stice E, Kazdin A, Offord D, Kupfer D. How do risk factors work together? Mediators, moderators, and independent, overlapping and proxy risk factors. *Am J Psychiatry.* 2001;158:848-56.

Last J. A dictionary of epidemiology, 4th ed. New York: Oxford University Press; 2000.

Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2004;31:1061-9.

Levy PS, Lemeshow S. Sampling of populations. Methods and applications. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1999:4-22.

Listgarten MA, Loomer PM. Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8:182-92.

Loesche WJ. Chemotherapy of Dental Plaque Infections. *Oral Sci Rev.* 1976;9:63-105.

Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2004;34:49-56.

MacMahon B, Pugh TF, Ipsen J. Epidemiology: Principles and methods. Boston: Little, Brown and Co.; 1960.

Maldonado G, Greenland S. Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol.* 1993;138:923-36.

Marsh PD, Møter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000.* 2011;55:16-35.

Papapanou PN. Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol*. 2002;7:54-61.

Papapanou PN, Baelum V, Luan W-M, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: Prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol*. 1997;68:651-66.

Papapanou PN, Teanpaisan R, Obiechina NS, Pithpornchaiyakul W, Pongpaisal S, Pisuthanakan S, et al. Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. *Eur J Oral Sci*. 2002;110:345-52.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001;183:3770-83.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006;42:80-7.

Patrick DL, Cheadle A, Thompson DC, Diehr P, Koepsell T, Kinne S. The validity of selfreported smoking: a review and meta-analysis. *Am J Public Health*. 1994;84:1086-93.

Pearce N. Epidemiology in a changing world: variation, causation and ubiquitous risk factors. *Int J Epidemiol*. 2011;40:503-12.

Pearce N, Merletti F. Complexity, simplicity and epidemiology. *Int J Epidemiol*. 2006;35:515-19.

Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndjaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*. 2005;83: 661-9.

Pinheiro ET, Kawamoto D, Ota-Tsuzuki C, Almeida LR, Nunes AC, Longo PL, et al. Analysis of genotypic variation in genes associated with virulence in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* clinical isolates. *J Periodont Res*. 2011;46:310-7.

Poulsen K, Ennibi OK, Haubek D. Improved PCR for detection of the highly leucotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4829-32.

Rothman KJ, Greenland S, Lash TL. *Modern Epidemiology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol*. 2008;35(Suppl. 8):346–61.

Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res*. 2005;40:277-85.

Sampaio E, Rocha M, Figueiredo LC, Faveri M, Duarte PM, Gomes Lira EA, et al. Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2011;38:838-46.

Schuman H, Presser S. *Questions and answers in attitude surveys*. New York: Academic Press; 1981.

Scott DA, Palmer RM, Stapleton JA. Validation of smoking status in clinical research into inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001;28:715-22.

Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2011: in press.

Shaddox LM, Walker C. Microbial testing in periodontics: value, limitations and future directions. *Periodontol 2000*. 2009;50:25-38.

Shrout P, Fleiss J. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull*. 1979;86:420-8.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25:134–44.

Spiekerman CF, Hujoel PP, DeRouen TA. Bias induced by self-reported smoking on Periodontitis – systemic disease associations. *J Dent Res*. 2003;82:345-9.

Streiner DL, Norman GR. *Health measurement scales. A practical guide to their development and use*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2008. p.14.

Susser M, Susser E. Choosing a future for epidemiology: I: Eras and paradigms. *Am J Public Health*. 1996; 86: 668-73.

Susin C. Periodontal diseases in a representative urban population in south Brazil [Doctor Odontologiae Thesis]. Bergen: University of Bergen; 2004.

Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Ikeda D, Koga T. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2002-5.

Szklo M, Javier Nieto F. Epidemiology: Beyond the basics. 2nd ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers; 2007.

Takada K, Saito M, Tsuzukibashi O, Kawashima Y, Ishida S, Hirasawa M. Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol*. 2010;25:200-6.

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

Teixeira RE, Mendes EN, Roque DE, Nicoli JR, Farias LM, Magalhães PP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Can J Microbiol*. 2006;52:182-8.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26:S4-S20.

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

Timmerman MF, Van der Weijden GA, Armand S, Abbas F, Winkel EG, Van Wilkelhoff AJ, et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Clinical and microbiological baseline data. *J Clin Periodontol*. 1998;25:215-24.

Timmerman MF, Van der Weijden GA, Abbas F, Arief EM, Armand S, Winkel EG, et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Longitudinal clinical data and prospective clinical and microbiological risk assessment. *J Clin Periodontol*. 2000;27:932–42.

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

Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: Findings from NHANES III. *J Periodontol*. 2000;71:743-51.

Tomasi C, Schander K, Dahlén G, Wennström JL. Short – term clinical and microbiologic effects of pocket debridement with an Er:YAG laser during periodontal maintenance. *J Periodontol*. 2006;77:111-8.

Van der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, Van der Velden U, Van Winkelhoff AJ. Java project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. *J Clin Periodontol*. 2008;35:487–92.

Van der Velden U, Abbas F, Armand S, Loos BG, Timmerman MF, Van der Weijden GA, et al. Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol*. 2006;33:540–8.

Van Winkelhoff AJ, Rijnsburger MC, van der Velden U. Clonal stability of *Porphyromonas gingivalis* in untreated periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2008; 35:674–9.

Xiang X, Sowa MG, Iacopino AM, Maev RG, Hewko MD, Man A, et al. An update on novel non-invasive approaches for periodontal diagnosis. *J Periodontol*. 2010;81:186-98.

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

Wagenknecht LE, Burke GL, Perkins LL, Haley NJ, Friedman GD. Misclassification of smoking status in the CARDIA study: a comparison of self-report with serum cotinine levels. *Am J Public Health*. 1992;82:33-6.

Wells AJ, English PB, Posner SF, Wagenknecht LE, Perez-Stable EJ. Misclassification rates for current smokers misclassified as nonsmokers. *Am J Public Health*. 1998;88:1503-9.

Woodward M, Tunstall-Pedoe H. An iterative technique for identifying smoking deceivers with application to the Scottish Heart Health Study. *Prev Med*. 1992;21:88-97.

World Health Organization (WHO). 4th ed. *Oral health surveys: basic methods*. Geneva: OMS; 1997.

Worachartcheewan A, Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Pidetcha P, Prachayasittikul V. Identification of metabolic syndrome using decision tree analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010;90:15-8.

Yao ES, Lamont RJ, Leu SP, Weinberg A. Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. *Oral Microbiol Immunol*. 1996;11:35-41.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 49/04**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa *"Análise da prevalência das doenças periodontal e cárie em populações isoladas do litoral do Rio de Janeiro"*, de responsabilidade da pesquisadora **Priscila Corraini**, sob orientação do Professor Doutor **Francisco Emílio Pustiglioni**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 29 de abril de 2004

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia
Departamento de Estomatologia
Disciplina de Periodontia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dissertação de Mestrado:

“EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL DESTRUTIVA EM UMA
POPULAÇÃO ADULTA ISOLADA BRASILEIRA: PREVALÊNCIA, EXTENSÃO,
SEVERIDADE E ASSOCIAÇÃO A FATORES AMBIENTAIS, BIOLÓGICOS E
COMPORTAMENTAIS”.

Você é convidado a participar de uma pesquisa que levantará dados referentes ao seu estado de saúde bucal através do Projeto Sorriso Marinho, com enfoque ao comportamento da cárie dental e de sua saúde gengival. Este estudo é feito pela aluna de mestrado da Faculdade de Odontologia da USP PRISCILA CORRAINI, sendo orientada pelo Prof. Dr. FRANCISCO EMILIO PUSTIGLIONI.

Se você concordar em participar da pesquisa, os procedimentos realizados serão a coleta de dados (em forma de uma tabela) que serão obtidos através de um exame de suas gengivas com um instrumento de medida e um cone de papel esterilizado, da realização de um índice de placa bacteriana, e além da possível realização de fotografias de sua boca (sem mostrar a face).

Este trabalho não oferece riscos à sua saúde, bem como qualquer tipo de dor ou desconforto, sem causar nenhum tipo de interferência tanto no tempo quanto na qualidade do atendimento no Projeto Sorriso Marinho, porém, oferece o desconforto peculiar a um exame odontológico.

Tanto seu nome quanto seus registros e seus arquivos fotográficos serão confidenciais, sendo apenas as informações obtidas pelo exame gengival utilizadas como dados para a pesquisa. Sua decisão de participar ou não da pesquisa não afetará seu atendimento pelo Projeto Sorriso Marinho, podendo também desistir a qualquer momento.

Você terá uma via deste documento.

Eu li todas as informações. Todas as dúvidas foram esclarecidas. Eu forneço meu consentimento para participar da pesquisa proposta.

NOME: _____

ASSINATURA DO SUJEITO DE PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL: _____

DATA: ____/____/____

ASSINATURA DO PESQUISADOR: _____

Telefone para contato: (11) 30225523

DATA: ____/____/____

ANEXO C – Questionário estruturado

Nome: _____ **Sexo:** _____

Data do exame- ____ / ____ / ____

Profissão: _____

Quantas pessoas moram na sua casa?: _____

Idade: _____ **Idade estimada:** _____

Já recebeu tratamento odontológico alguma vez na vida?.....S__ N__

Escova os dentes quantas vezes ao dia? _____

Você fuma atualmente?.....S__ N__

Se SIM: Por quanto tempo?: _____ ano(s)

Quantidade/dia: _____ maço(s) (20 cigarros por maço)

Tipo(s) de hábito: _____

Se NÃO:

Você já fumou mais de 100 cigarros durante a vida?S__ N__

SE SIM: Por quanto tempo você fumou?: _____ ano(s)

Há quantos anos você parou de fumar?: _____

Frequência por dia: _____ maço(s)

Tipo(s) de hábito: _____

Diabetes (> 200 mg/dL):.....S__ N__

2ª vez?:.....S__ N__

Está grávida?..... S__ N__

Nº de partos: _____

Grau de escolaridade:

Já estudou alguma vez?..... S__ N__

Anos de estudo: _____

Você sabe ler e escrever?..... S__ N__

Renda familiar:

Nenhuma (consome o que produz).....S__ N__

Valor mensal médio: _____ salários mínimos

Sua renda é variável?S__ N__

ANEXO D – Ficha clínica

Nome: _____

Arco superior / face vestibular

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
LEC-MG														
PCS														
NCI														
placa/cálculo?														

Arco superior / face palatina

	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
LEC-MG														
PCS														
NCI														
placa/cálculo?														

Arco inferior / face vestibular

	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
LEC-MG														
PCS														
NCI														
placa/cálculo?														

Arco inferior / face lingual

	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
LEC-MG														
PCS														
NCI														
placa/cálculo?														

Índice CPO-D = _____