DANIELE SALAMI LOURENÇÃO

**Detecção e quantificação de bactérias no biofilme subgengival de indivíduos
com diferentes formas de doença periodontal**

São Paulo

2010

DANIELE SALAMI LOURENÇÃO

**Detecção e quantificação de bactérias no biofilme subgengival de indivíduos
com diferentes formas de doença periodontal**

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Assoc. Giorgio De Micheli

São Paulo
2010

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-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lourenção, Daniele Salami

Detecção e quantificação de bactérias no biofilme subgengival de indivíduos com diferentes formas de doença periodontal / Daniele Salami Lourenção; orientador Giorgio De Micheli. -- São Paulo, 2010.

89p. : fig., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Doenças periodontais. 2. Reação em Cadeia por Polimerase. 3. Periodontite. 4. Gengivite. 5. Microbiologia. I. De Micheli, Giorgio. II. Título.

Lourenção DS. Detecção e quantificação de bactérias no biofilme subgengival de indivíduos com diferentes formas de doença periodontal. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / / 2010

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico com muito carinho este trabalho

Aos meus queridos pais, **Pedro e Rose**, exemplos perfeitos de amor e de compreensão. Obrigada por sempre estarem ao meu lado e por sempre me apoiarem incondicionalmente em todos os momentos da minha vida. Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui e vencido mais essa etapa. Devo a vocês dois tudo o que sou hoje. Amo vocês!

À minha irmã **Tais**, minha inspiração profissional. Obrigada pelo incentivo, pela amizade e pelo carinho. Tenho muito orgulho de você.

À minha irmã **Ju**. Obrigada pela ajuda constante em todos momentos da minha vida, mesmo quando distante você sempre esteve presente no meu coração.

Ao meu marido **Rodrigo**. Obrigada pela amizade, pela paciência, pela compreensão e por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação. Seu apoio incondicional me conforta e me dá forças para superar meus desafios.

À Deus, por sempre me guiar e por colocar pessoas tão especiais na minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo** (*in memoriam*) pela idealização desse trabalho, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo de força e dedicação. Meu profundo agradecimento por ter acreditado que este trabalho era possível.

Ao **Prof. Assoc. Giorgio De Micheli** pela confiança em mim depositada. Obrigada por ter me aceito como sua orientada.

Ao **Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata** por ter gentilmente “aberto as portas” do seu laboratório, apoiando e acreditando na realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos de forma tão simples e humilde. Agradeço o privilégio de ter feito parte da equipe de alunos do LABMAD.

À doutoranda **Ariana Soares Rodrigues** pela amizade e pelos momentos de dificuldades e de superação compartilhados durante a execução desse trabalho.

Ao **Prof. Assoc. Fabio Daumas Nunes** e a **Ilíria Salomão Feist** pela valorosa colaboração no exame de Qualificação.

Ao **Prof. Dr. Marco Antônio Paupério Georgetti** que, além de ser meu “pai científico”, é também um grande amigo a quem tenho profunda admiração. Não tenho palavras que possam retratar fielmente minha gratidão por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar ao seu lado e abrir meus horizontes para a realização de uma Odontologia mais humana. Obrigada por ensinar-me, através da palavra e do exemplo, que a busca pelo conhecimento deve ser contínua.

A **Selma Tera** e a doutoranda **Verônica Franco de Carvalho**, muito obrigada por vocês serem amigas tão especiais. “Amigos são anjos que nos ajudam a voar quando não conseguimos abrir as asas”. Vocês fazem parte dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni**, pela oportunidade de integrar o curso de Pós-Graduação.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da FOUSP, **Prof. Ass. Cesário Antônio Duarte, Prof. Ass. Luís Antônio Pugliesi Alves de Lima, Prof. Ass. Giuseppe Alexandre Romito, Prof. Dr. Koto Nakae, Prof. Dr. Marco Antônio P. Georgetti, Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti, Profa. Dra. Marina Clemente Conde, Profa. Dra. Luciana Saraiva de Campos, Prof. Dr. João Batista C. Neto, e Profa. Dra. Marinella Holzhausen**, pelos valiosos ensinamentos e agradável convívio durante o curso de graduação e de pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti**, pela ajuda na análise estatística dos resultados deste trabalho, nas correções do artigo e pelas sugestões e críticas bastante pertinentes na minha pré-defesa.

Aos meus queridos companheiros de turma: **Silvia Linard Marcelino, Vanessa Tubero E. Alves, Leandro Chambrone, Mariana S. Ragghianti, André M. Hespanhol e Flávia Sukekava**, muito obrigada pelos muitos momentos de estudo e de descontração divididos durante os seminários e as clínicas. Obrigada pela amizade, pelas risadas e pelos conhecimentos compartilhados durante os anos que passamos juntos no curso de pós-graduação.

Aos colegas de pós-graduação: **Osmar, Rodrigo Nahás, Rodrigo Santos, Marcio Seto, Priscila, Ana Karina, Carlinhos, Christiane, Cássio, Fernando Soares, Nívea, Fábio, Carmen, Fernando Hayashi, Caroline Paixão, Caroline Calil, Juliana Aun, Hsu, Ecinele, Sabrina, Cassia, Ricardo Takiy, Valéria, Isabella, Joseane, Rogéria, Samuel e Luciana**, pelos momentos compartilhados durante o transcorrer do curso.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP: **Gisele, Silvia, Simone, Joás,**

Álvaro Cerda, Álvaro Minishikawa, Walkíria, Marcela, Débora, Jacqueline, Daniel, Aécio, Alice, Raquel, Fabíola, Fabiana, Elizandra, Maria Alice e Patrícia, muito obrigada pelo agradável convívio. Em especial agradeço a técnica **Cristina Moreno Fajardo** e os doutorandos **Lídio G. Lima Neto, André D. Luchessi e Vivian N. Silbiger,** pelos conhecimentos transmitidos e por sempre estarem disponíveis a me ajudarem.

À **Profa. Ass. Rosário Dominguez Crespo Hirata,** pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman,** pela colaboração com a cultura das cepas bacterianas.

À aluna do programa de Iniciação Científica, **Camila Rivoli Kiyohara,** pela ajuda na execução da parte clínica deste trabalho.

Às secretárias da Disciplina de Periodontia **Márcia Maria dos Santos e Marília Camargo Gomes,** pela amizade e pela ajuda sempre pronta em qualquer momento.

Aos meus sogros **Ana e Artur,** pelo carinho e pela ajuda que sempre me deram. Considero vocês meus pais de coração.

Aos meus cunhados **Leandro, Olivier e Fred** pelo agradável convívio e apoio sempre presentes.

Às funcionárias da Biblioteca da FOU SP, **Vânia Martins B. de Oliveira Funaro e Maria Cláudia Pestana,** pelo auxílio na formatação deste trabalho.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),** que tornou viável a realização desta pesquisa através da concessão do Auxílio à Pesquisa (processo 2007/56098-8).

À **CAPES,** pela bolsa de mestrado.

À todos os pacientes que espontaneamente concordaram em participar desta pesquisa.

Agradeço também a todos aqueles que, mesmo não citados, de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Dê ao mundo o melhor de você. Mas isso pode não ser o bastante.

Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final das contas, é tudo entre VOCÊ e DEUS.

Nunca foi entre você e os outros.

Agnes Gonxha Bojaxhiu

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Lourenção DS. Detecção e quantificação de bactérias no biofilme subgengival de indivíduos com diferentes formas de doença periodontal [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010

Os objetivos desse estudo transversal foram avaliar a presença e a quantidade subgengival de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Dialister pneumosintes*, em indivíduos portadores de Gingivite associada apenas à placa bacteriana, Periodontite Crônica e Periodontite Agressiva, e correlacionar os resultados quantitativos com parâmetros clínicos periodontais (PCS e NCI). Dados clínicos e amostras de placa bacteriana subgengival foram coletados de um total de 176 indivíduos sendo, 67 indivíduos com Gingivite associada apenas à placa bacteriana (Grupo G), 71 com Periodontite Crônica (Grupo PC) e 38 com Periodontite Agressiva (Grupo PA). As amostras clínicas foram processadas pela PCR em tempo real através do uso de iniciadores e sondas específicos para regiões altamente conservadas do gene 16S rRNA de cada espécie bacteriana. Os resultados demonstraram a detecção dos cinco patógenos nos três grupos analisados, havendo associação significativa entre grupo e presença da bactéria para *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *D. pneumosintes* ($p < 0,01$). A bactéria *A. actinomycetemcomitans* apresentou semelhantes frequências de detecção nas condições periodontais analisadas (Grupo G, 100%; Grupo PC, 94,4%; Grupo PA, 92,1%), não havendo associação significativa entre grupo e presença dessa bactéria ($p = 0,09$). As quantidades subgengivais de *A. actinomycetemcomitans* e de *T. forsythia* foram significativamente maiores no grupo PA ($1,66 \times 10^6 \pm 5,39 \times 10^6$ e $1,96 \times 10^6 \pm 4,82 \times 10^6$, respectivamente), em relação aos grupos G ($8,28 \times 10^4 \pm 1,76 \times 10^5$ e $3,86 \times 10^5 \pm 1,96 \times 10^6$, respectivamente) e PC ($2,25 \times 10^4 \pm 3,11 \times 10^4$ e $3,59 \times 10^5 \pm 1,40 \times 10^6$, respectivamente), não havendo diferenças significativas entre os grupos para as cargas subgengivais das demais bactérias. A correlação obtida entre as cargas bacterianas subgengivais e os parâmetros clínicos, PCS e NCI, foi fraca ou muito fraca.

Palavras-chave: Doenças Periodontais. Reação em Cadeia por Polimerase. Periodontite. Gingivite. Microbiologia.

ABSTRACT

Lourenção DS. Detection and Quantification of Subgingival Bacteria in Brazilian Periodontal Subjects [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010

The aims of this cross-sectional study were to evaluate the presence and subgingival quantity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* and *Dialister pneumosintes*, in individuals with Gingivitis associated with dental plaque only, Chronic Periodontitis and Aggressive Periodontitis, and correlate the quantitative results with periodontal clinical parameters (PD and CAL). Clinical data and subgingival plaque samples were collected from a total number of 176 individuals, among whom there were 67 individuals with Gingivitis associated with dental plaque only (Group G), 71 with Chronic Periodontitis (Group CP) and 38 with Aggressive Periodontitis (Group AP). The clinical samples were processed by real-time PCR with the use of specific primers and probes for regions of the highly conserved 16S rRNA gene of each bacterial species. The results demonstrated the detection of the five pathogens in the three analyzed groups, and there was significant association between the group and presence of the bacteria for *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* and *D. pneumosintes* ($p < 0.01$). The bacterium *A. actinomycetemcomitans* presented similar frequencies of detection under the periodontal conditions analyzed (Group G, 100%; Group CP, 94.4%; Group AP, 92.1%), and there was no significant association between group and the presence of this bacterium ($p = 0.09$). The subgingival quantities of *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia* were significantly higher in the Group AP ($1.66 \times 10^6 \pm 5.39 \times 10^6$ and $1.96 \times 10^6 \pm 4.82 \times 10^6$, respectively), in comparison with Groups G ($8.28 \times 10^4 \pm 1.76 \times 10^5$ and $3.86 \times 10^5 \pm 1.96 \times 10^6$, respectively) and CP ($2.25 \times 10^4 \pm 3.11 \times 10^4$ and $3.59 \times 10^5 \pm 1.40 \times 10^6$, respectively), there being no significant differences among the groups with regard to the subgingival loads of the other bacteria. The correlation obtained between the subgingival bacterial loads and the clinical parameters PD and CAL was weak or very weak.

Key Words: Periodontal diseases. Polymerase Chain Reaction. Periodontitis.
Gingivitis. Microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Clonagem em plasmídeo	44
Figura 4.2 - Gel do produto de amplificação da bactéria <i>P. gingivalis</i>	47
Figura 4.3 - Curva padrão da bactéria <i>A. actinomycetemcomitans</i>	53
Figura 4.4 - Curva padrão da bactéria <i>P. gingivalis</i>	53
Figura 4.5 - Curva padrão da bactéria <i>T. forsythia</i>	53
Figura 4.6 - Curva padrão da bactéria <i>T. denticola</i>	54
Figura 4.7 - Curva padrão da bactéria <i>D. pneumosintes</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Critérios de escolha dos sítios para coleta microbiológica	42
Tabela 4.2 - Cepas bacterianas	45
Tabela 4.3 - Iniciadores utilizados na PCR	46
Tabela 4.4 - Sondas TaqMan® utilizadas na PCR em tempo real	52
Tabela 5.1 - Descrição dos dados clínicos	56
Tabela 5.2 - Parâmetros clínicos dos sítios das coletas microbiológicas	57
Tabela 5.3 - Porcentagem de indivíduos positivos para as bactérias analisadas nos grupos G, PC e PA	58
Tabela 5.4 - Porcentagem de indivíduos positivos para as bactérias analisadas nos grupos G e P	59
Tabela 5.5 - Descrição do número de amostras clínicas quantificadas	60
Tabela 5.6 - Médias dos valores quantitativos das bactérias analisadas	60
Tabela 5.7 - Correlação entre parâmetros clínicos e quantidades de células bacterianas subgengivais	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Nucleotídeo Adenina
AAP	<i>American Academy of Periodontology</i> / Academia Americana de Periodontia
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Actinobacillus</i> ou <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. forsythus</i>	<i>Bacteroides forsythus</i>
<i>B. gingivalis</i>	<i>Bacteroides gingivalis</i>
<i>B. intermedius</i>	<i>Bacteroides intermedius</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i> / ciclo limiar
DMSO	Solução de dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo fosfato
<i>D. pneumosintes</i>	<i>Dialister pneumosintes</i>

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>E. nodatum</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>
<i>F.nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
G	Nucleotídeo Guanina
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MG-JEC	Distância da margem gengival à junção esmalte-cimento
NCI	Nível clínico de inserção
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
PBS	Phosphate - bufferid saline / Tampão salino fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> / Reação em cadeia da polimerase

PCS	Profundidade clínica de sondagem
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Ph	Potencial hidrogeniônico
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PJ	Periodontite Juvenil
PJG	Periodontite Juvenil Generalizada
PJL	Periodontite Juvenil Localizada
<i>P. nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid / ácido ribonucleico ribossômico
SS	Sangramento à sondagem
T	Nucleotídeo Timina
TBE	Tampão borato EDTA
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
U	Unidade
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

g	unidade de medida referente a força centrífuga
μl	unidade de medida referente a microlitro
μg	unidade de medida referente a micrograma
mg	unidade de medida referente a miligrama
ml	unidade de medida referente a mililitro
mm	unidade de medida referente a milímetro
mM	unidade de medida referente a milimolar
nm	unidade de comprimento referente a nanômetro
nM	unidade de medida referente a nanomolar
°C	unidade de teperatura referente a Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Etiologia bacteriana das Doenças Periodontais	21
2.2 Quantificação de bactérias pela PCR em tempo real	33
3 PROPOSIÇÃO	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Seleção da amostra	40
4.2 Registro dos parâmetros clínicos	41
4.3 Coleta das amostras clínicas	42
4.4 Avaliação Microbiológica	43
4.4.1 Obtenção dos controles para quantificação pela PCR em tempo real	44
4.4.2 Extração de DNA das amostras clínicas	50
4.4.3 Realização da PCR em tempo real	51
4.5 Análise estatística	54
5 RESULTADOS	56
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE	85
ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais constituem um grupo de doenças que acometem as estruturas de proteção e de sustentação dos elementos dentais, e estão associadas a fatores etiológicos locais e sistêmicos. Dentre esses fatores, a placa bacteriana (ou biofilme dental) é considerada o principal fator causal (Socransky; Haffajee, 1992, 2005). Estudos clássicos como os de Løe et al. (1965), Slots (1977a, 1977b, 1979) e Socransky (1979), entre outros, tornaram incontestável a natureza infecciosa da maioria das doenças periodontais ao demonstrarem a relação positiva entre o acúmulo de placa bacteriana e a inflamação dos tecidos periodontais. Apesar de mais de 400 espécies bacterianas terem sido identificadas nas infecções periodontais, somente uma pequena quantidade foi associada com a etiologia das doenças periodontais destrutivas. Para a maioria das espécies ainda faltam evidências científicas que comprovem sua relação causal com o início e a progressão das doenças periodontais (Haffajee; Socransky, 1994; Moore; Moore, 1994; American Academy of Periodontology, 1996, 1999; Socransky et al., 1998; Slots; Ting, 1999; Paster et al., 2001; Ezzo; Cutler, 2003; Socransky; Haffajee, 2005; Paster et al., 2006).

As bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* são consideradas como verdadeiros patógenos periodontais (Haffajee; Socransky, 1994; American Academy of Periodontology, 1996; Slots; Ting, 1999; Ezzo; Cutler, 2003; Holt; Ebersole, 2005; Tanner; Izard, 2006). Proporções elevadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e, em algumas populações, de *Porphyromonas gingivalis* estão normalmente presentes na microbiota subgengival de indivíduos portadores de Periodontite Agressiva (Tonetti; Mombelli, 1999). A associação das bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* no biofilme subgengival, denominada como “complexo vermelho”, está fortemente relacionada com a etiologia da Periodontite Crônica (Socransky et al., 1998; Holt; Ebersole, 2005).

Estudos recentes têm sugerido a inclusão da bactéria *Dialister pneumosintes* no grupo dos suspeitos patógenos periodontais, devida à sua alta prevalência nas lesões periodontais avançadas e à sua baixa prevalência em crianças e adultos

jovens com Gengivite (Contreras et al., 2000; Doan et al., 2000; Ghayoumi et al., 2002; Nonnenmacher et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2005; Ferraro et al., 2007).

A detecção de microrganismos nas amostras de placa bacteriana depende da metodologia utilizada e, freqüentemente, os estudos microbiológicos empregaram técnicas de cultura. Apesar da técnica de cultura ser considerada o “padrão ouro” dos testes diagnósticos, a diversidade microbiológica pode ser grandemente subestimada por essa metodologia devida às dificuldades de isolamento e cultura de vários microrganismos pelas técnicas padrões (Haffajee; Socransky, 1994; Ashimoto et al., 1996; Chen; Slots, 1999; Loomer, 2004; Paster et al., 2006). Dessa maneira, para as pesquisas microbiológicas em periodontia, as técnicas clássicas de cultura vêm sendo substituídas pelas técnicas de biologia molecular que apresentam reconhecida superioridade em termos de sensibilidade, especificidade e rapidez (Chen; Slots, 1999; Conrads, 2002; van Winkelhoff, 2003; Loomer, 2004; Mackay, 2004; Sanz et al., 2004; Sakamoto et al., 2005).

Entre as técnicas microbiológicas capazes de quantificar as cargas bacterianas subgengivais, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real mostrou ser o método mais específico e sensível disponível (Conrads, 2002; Loomer, 2004; Mackay, 2004; Sanz et al., 2004; Sakamoto et al., 2005). O sistema TaqMan® utiliza uma sonda duplamente marcada com corantes distintos e iniciadores (*primers*) espécie-específicos, capazes de hibridizarem com uma sequência de nucleotídeos específica presente no genoma da bactéria alvo. Durante a reação de amplificação, a sonda é degradada devido à atividade exonuclease 5'-3' da enzima *Taq DNA polimerase*, levando à emissão de fluorescência detectável pelo equipamento. Esse sinal fluorescente é proporcional à quantidade de produtos formados a cada ciclo da reação, e é quantificado através da comparação com a amplificação de padrões de concentrações conhecidas (Heid et al., 1996; Mackay, 2004; Sanz et al., 2004; Sakamoto et al., 2005; Houghton; Cockerill, 2006; Kubista et al., 2006).

Estudos têm relatado a utilidade do sistema TaqMan® para a quantificação absoluta de periodontopatógenos (Lyons et al., 2000; Asai et al., 2002; Boutaga et al., 2003, 2005, 2006; Kawada et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Yoshida et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Nonnenmacher et al., 2005; Gomes et al., 2006; Mineoka et al., 2008). Alguns desses estudos demonstraram que, embora patógenos periodontais semelhantes possam ser detectados no

biofilme subgengival de indivíduos periodontalmente saudáveis e doentes, as quantidades subgengivais desses patógenos podem ser diferentes entre as condições de saúde e de doença periodontal, sugerindo a hipótese de que as cargas bacterianas precisam ultrapassar certo limite crítico no ambiente subgengival para induzirem a destruição tecidual no hospedeiro (Lyons et al., 2000; Asai et al., 2002; Nonnenmacher et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2005; Boutaga et al., 2006).

No entanto, a relação das cargas bacterianas subgengivais com o início e a progressão das doenças periodontais ainda não está clara, havendo a necessidade de um número maior de estudos para a melhor compreensão do papel etiológico das espécies bacterianas nas doenças periodontais. Poucos estudos quantificaram, através da PCR em tempo real, as cargas subgengivais de periodontopatógenos na Periodontite Agressiva, e nenhum na Gengivite.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a presença e a quantidade subgengival das bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Dialister pneumosintes* em indivíduos com Gengivite associada apenas à placa bacteriana, Periodontite Crônica e Periodontite Agressiva, utilizando a técnica da PCR em tempo real, e correlacionar os resultados quantitativos com parâmetros clínicos periodontais (profundidade clínica de sondagem e nível clínico de inserção).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão de literatura que será apresentada a seguir, as denominações das espécies bacterianas serão mantidas de acordo com a nomenclatura taxonômica vigente na época da publicação dos artigos, a fim de não se alterar as características originais das publicações. Também manteremos os diagnósticos originais das doenças periodontais resultantes de classificações anteriores à classificação da Academia Americana de Periodontia (AAP) de 1999 (American Academy of Periodontology, 1999).

2.1 Etiologia bacteriana das Doenças Periodontais

Parece não haver mais dúvidas de que a presença de microrganismos no interior do sulco/bolsa periodontal seja o fator determinante para o início e o desenvolvimento da maioria das doenças periodontais (Socransky; Haffajee, 2005).

As investigações sobre a etiologia das doenças periodontais iniciaram-se na chamada “Era de Ouro da Microbiologia” (1880-1920). Nessa época, quatro grupos distintos de microrganismos foram propostos como possíveis agentes etiológicos das doenças periodontais: amebas, espiroquetas, fusiformes e estreptococos. A identificação desses quatro grupos de microrganismos na placa dental foi o resultado da natureza das técnicas microbiológicas disponíveis na época, levando a resultados equivocados. A fase seguinte, de 1925 a 1950, foi marcada por um período onde a ausência de sucesso das terapias direcionadas à eliminação dos supostos patógenos levou a dúvidas quanto à etiologia bacteriana das doenças periodontais (Socransky; Haffajee, 1994).

No início da década de 60, pesquisadores clínicos enfatizaram a necessidade do controle da placa bacteriana para a prevenção e tratamento das doenças periodontais, considerando que o acúmulo inespecífico de microrganismos na margem gengival e/ou abaixo desta levava ao desenvolvimento de um processo inflamatório responsável pela destruição dos tecidos periodontais (Löe et al., 1965; Theilade et al., 1966; Löe et al., 1967). De acordo com essa hipótese ou “teoria da

placa não específica”, o aumento na quantidade de microrganismos era mais importante do que os tipos de microrganismos presentes no biofilme dental para a etiologia das doenças periodontais. Considerava-se também que a composição da placa bacteriana era relativamente semelhante entre indivíduos e diferenças relativamente pequenas eram atribuídas entre sítios saudáveis e doentes. Um dos estudos clássicos realizados nessa época é o da “Gengivite experimental em humanos” de Løe et al. (1965), que demonstrou uma forte relação entre o acúmulo da placa bacteriana e o desenvolvimento da inflamação dos tecidos periodontais.

A partir da década de 70 e no decorrer da década de 80, quando o aperfeiçoamento das técnicas microbiológicas de cultura tornou possível a identificação de microrganismos anaeróbios, houve um grande impulso na realização de estudos sobre o papel das espécies bacterianas no desenvolvimento das doenças periodontais. A questão não era mais se microrganismos estavam associados à etiologia das doenças periodontais, mas se microrganismos específicos eram responsáveis por formas específicas de doença periodontal. Esses estudos associaram a presença de grupos específicos de microrganismos a condições clínicas periodontais específicas, e identificaram diferenças na composição da placa bacteriana subgengival entre sítios saudáveis, sítios com inflamação e sem perda de inserção e sítios com perda de inserção periodontal.

Loesche, em 1976, postulou a “teoria da placa específica” baseado no fato de que certos microrganismos como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Veillonella parvula*, além de várias espécies de *Actinomyces*, estavam sempre presentes nos quadros de saúde periodontal ou de mínima doença, enquanto que outros microrganismos como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) e espiroquetas, estavam relacionados a condições de doença periodontal. Essa hipótese foi fundamentada por inúmeros outros estudos que avaliaram a composição da placa bacteriana subgengival de diferentes formas de doença periodontal (Newman et al., 1976; Slots, 1976, 1977a, 1977b, 1979; Newman; Socransky, 1977; Socransky, 1977; Slots et al., 1978; Tanner et al., 1979; Slots et al., 1980; Moore et al., 1982a; Moore et al., 1982b; Moore et al., 1983; Moore et al., 1985; Moore et al., 1987).

Em 1979, Socransky sugeriu critérios ou linhas de evidência para a associação de espécies bacterianas com a etiologia das infecções periodontais. Esses critérios incluíam: (I) associação com a doença, (II) eliminação/supressão do

microrganismo, (III) resposta do hospedeiro, (IV) modelos animais e (V) fatores de virulência. A presença de estudos que comprovem a aplicação destes critérios aos patógenos da microbiota periodontal é fundamental para definir quais microrganismos podem ser considerados como verdadeiros agentes etiológicos das formas crônica e agressiva das periodontites (Armitage, 2010).

O microrganismo *A. actinomycetemcomitans* começou a ser detectado, pelos estudos de cultura, em maiores freqüências e proporções nas amostras de placa subgengival de indivíduos com Periodontite Juvenil (PJ), principalmente na forma localizada dessa doença (Tanner et al., 1979; Slots et al., 1980; Mandell; Socransky, 1981; Zambon et al., 1983; Zambon, 1985; Genco et al., 1986; Müller et al., 1993; Gainet et al., 1999).

Slots et al. (1980), avaliaram a distribuição de *A. actinomycetemcomitans* em 10 indivíduos jovens e 12 adultos, periodontalmente saudáveis ou com inflamação gengival leve, em 10 indivíduos jovens com diagnóstico de Periodontite Juvenil localizada (PJL) e 12 adultos com Periodontite do Adulto. Um total de 381 amostras foi coletado: 172 de sítios saudáveis, 83 de bolsas periodontais, 42 de mucosa jugal, 42 de dorso de língua e 42 de saliva. Foram realizadas culturas em meio seletivo para *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados demonstraram que em 20% dos jovens saudáveis, em 36% dos adultos saudáveis, em 50% dos adultos doentes e em 90% dos jovens doentes, houve a detecção de *A. actinomycetemcomitans*. Além disso, as bolsas periodontais apresentaram uma taxa de detecção desse patógeno cinco vezes maior do que os sítios saudáveis.

Com a finalidade de avaliar a presença de *A. actinomycetemcomitans* na doença periodontal, Zambon et al. (1983) analisaram, através de cultura, coletas de placa bacteriana subgengival de um total de 403 indivíduos divididos em 4 grupos: PJL (n=29), Periodontite do Adulto (n=134), saudáveis (n=142) e indivíduos jovens diabéticos com Gengivite (n=98). As amostras de 96,5% dos indivíduos com PJL foram positivas para *A. actinomycetemcomitans* enquanto que a presença desse microrganismo nos outros 374 indivíduos não portadores de PJ foi de 15,2%, sendo 20,8% para os indivíduos com Periodontite do Adulto, 16,9% para os indivíduos saudáveis e 5,1% para os jovens diabéticos com Gengivite.

Uma revisão da literatura sobre o papel da bactéria *A. actinomycetemcomitans* nas doenças periodontais, reuniu os resultados de estudos microbiológicos, imunológicos, histopatológicos e terapêuticos e concluiu que esse

microrganismo é um agente etiológico importante para a PJL. Suas características morfológicas, bioquímicas, sorológicas e seus fatores de virulência também foram descritos. As evidências responsáveis pela associação desse microrganismo com a etiologia da PJL incluíram: alta prevalência nos indivíduos com PJL e nos membros das suas famílias comparada com outros grupos de doenças periodontais; presença de quantidades elevadas de anticorpos na saliva, soro e fluido gengival nos indivíduos com PJL; possibilidade de sucesso terapêutico através da eliminação do microrganismo nas bolsas periodontais; capacidade de invadir o tecido conjuntivo gengival e capacidade de produzir diversos fatores de virulência (leucotoxinas, endotoxinas, fator inibitório de quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, fosfatases, collagenases, fator inibitório de fibroblastos, etc.) (Zambon, 1985).

Espécies bacterianas semelhantes foram detectadas pelos estudos de cultura nas microbiotas subgengivais associadas à Gengivite e às periodontites, porém em frequências diferentes, geralmente maiores nas condições de destruição periodontal (Moore et al., 1987; Slots; Listgarten, 1988; Müller et al., 1993; Moore; Moore, 1994).

Moore et al. (1987) avaliaram a microbiota subgengival de indivíduos com Gengivite. A composição da microbiota desses indivíduos foi comparada com a microbiota de controles saudáveis, de indivíduos com PJL (Moore et al., 1985), de indivíduos com Periodontite Juvenil generalizada (PJG) (Moore et al., 1982b) e de indivíduos com Periodontite Crônica (Moore et al., 1983). Os resultados desse estudo demonstraram que a microbiota associada à Gengivite difere tanto da microbiota associada à saúde quanto da microbiota associada à destruição periodontal. Algumas espécies, como *Bacteroides gingivalis* (*B. gingivalis*), apresentaram proporções elevadas nos sítios com destruição periodontal, mas não foram detectadas ou não apresentaram proporções significativas nos sítios com Gengivite. Dez espécies bacterianas não foram isoladas de indivíduos com saúde periodontal, mas foram detectadas em indivíduos com Gengivite e apresentaram um grande aumento das suas proporções em indivíduos com PJL, PJG e Periodontite Crônica. Entre essas espécies estavam: *Eubacterium nodatum* (*E. nodatum*), *Fusobacterium alocis*, *Haemophilus actinomycetemcomitans* e *Treponema denticola* (*T. Denticola*). O microrganismo *Haemophilus actinomycetemcomitans* não foi detectado em indivíduos saudáveis, apresentou proporções baixas em indivíduos com Gengivite e quantidades maiores em indivíduos com PJL.

Um resumo dos achados microbiológicos baseados em técnicas de cultura de uma série de trabalhos desenvolvidos por Slots (1976, 1977a, 1977b, 1979) e Slots et al. (1978) foi apresentado por Slots e Listgarten (1988). A composição da microbiota subgengival associada a indivíduos periodontalmente saudáveis, com Gengivite, com Periodontite do Adulto avançada e com PJ, foram descritas. O sulco gengival saudável apresentou uma microbiota composta predominantemente por microrganismos Gram-positivos (85%), anaeróbios facultativos, apresentando principalmente espécies de *Streptococcus* e de *Actinomyces*. O desenvolvimento da Gengivite foi acompanhado por um aumento significativo de microrganismos Gram-negativos e anaeróbios. *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), espécies de *Haemophilus*, *Bacteroides intermedius* (*B. intermedius*) e outras espécies de *Bacteroides* não pigmentados de preto compreenderam cerca de 45% do total de isolados na Gengivite. A microbiota presente nos indivíduos com Periodontite do Adulto apresentou principalmente bacilos Gram-negativos (75%) e anaeróbios (90%). *B. gingivalis*, *B. intermedius*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, espécies de *Bacteroides* não pigmentados de preto e espécies de *Wolinella*, foram os microrganismos predominantes. A microbiota da PJ também foi composta na sua maior parte por microrganismos Gram-negativos (65%) e anaeróbios (80%), porém sua composição diferiu daquela encontrada na Periodontite do Adulto, apresentando *B. intermedius*, *A. actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*) e espécies de *Capnocytophaga*. Os autores indicaram as bactérias *B. gingivalis*, *B. intermedius* e *A. actinomycetemcomitans* como sendo patógenos importantes para as doenças periodontais destrutivas.

Moore e Moore (1994) também analisaram os resultados obtidos com uma série de investigações microbiológicas de diferentes condições periodontais (Moore et al., 1982a; Moore et al., 1982b; Moore et al., 1983; Moore et al., 1985; Moore et al., 1987). Na comparação de sítios com índice gengival 1 e 2, ocorreu um aumento significativo de espécies relacionadas com a perda de inserção periodontal como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *P. intermédia* e *E. nodatum*. Espécies de *Treponema*, como *T. denticola*, foram detectadas freqüentemente nos sítios periodontalmente saudáveis e apresentaram um aumento das suas proporções com a progressão da Gengivite para a perda de inserção periodontal. *Dialister pneumosintes* (*D. pneumosintes*) foi uma espécie que não apresentou uma proporção significativa nos sítios com índice gengival igual a 2, mas em sítios com

perda de inserção periodontal suas proporções aumentaram significativamente com o aumento da gravidade da doença. Os autores concluíram que nenhum microrganismo pôde ser considerado como o único agente causal das condições periodontais investigadas (Gengivite, Periodontite do Adulto, PJL e PJG) porque nenhuma espécie bacteriana apresentou uma proporção maior do que 3% do total de isolados em cada uma dessas formas de doença periodontal.

Müller et al. (1993) compararam, através de cultura, a detecção de *A. actinomycetemcomitans* em amostras de placa subgengival de 10 indivíduos com Gengivite, 18 com PJL, 45 com Periodontite de Progressão Rápida e 32 com Periodontite do Adulto. Os resultados mostraram que 56% dos indivíduos com Periodontite de Progressão Rápida foram positivos para a presença do *A. actinomycetemcomitans*, enquanto que somente um indivíduo com PJL não apresentou esse microrganismo. Um total de 28% dos indivíduos com Periodontite do Adulto e somente 10% dos indivíduos com Gengivite apresentaram detecção de *A. actinomycetemcomitans*.

Os estudos de cultura também demonstraram que a progressão da perda de inserção periodontal foi relacionada principalmente com as espécies *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *F. nucleatum*, *Campylobacter rectus* (*C. rectus*) e *P. intermedia* (Tanner et al., 1984; Slots, 1986; Mandell et al., 1987; Dzink et al., 1988; van Winkelhoff et al., 1988; Maiden et al., 1990; Rodenburg et al., 1990; Haffajee et al., 1991; Grossi et al., 1994; Rams et al., 1996; Tanner et al., 1998).

Rams et al. (1996) avaliaram parâmetros clínicos e microbiológicos de indivíduos com Periodontite do Adulto em programa de manutenção periodontal. Os resultados do estudo demonstraram um risco de 2,5 vezes maior para a recorrência da atividade destrutiva da doença periodontal, em 12 meses, para indivíduos que apresentaram no início do estudo proporções subgengivais $\geq 0,01\%$ de *A. actinomycetemcomitans*, $\geq 0,1\%$ de *P. gingivalis*, $\geq 2,5\%$ de *P. intermedia*, $\geq 2,0\%$ de *C. rectus* ou $\geq 3,0\%$ de *Peptostreptococcus micros*. A simples detecção dessas 5 espécies bacterianas no início do estudo, independentemente das suas proporções cultiváveis, não foi suficiente para prever o risco de recorrência da doença periodontal. Assim, os autores afirmaram que as avaliações qualitativas da microbiota subgengival, através de cultura ou de outros métodos microbiológicos,

parecem ter utilidade menor no diagnóstico periodontal do que a determinação das quantidades dos patógenos nas amostras de placa bacteriana subgengivais.

Apesar das técnicas de cultura serem consideradas o método clássico para a detecção de espécies bacterianas e serem o único método capaz de determinar *in vitro* a susceptibilidade antimicrobiana desses microrganismos, algumas limitações inerentes a essas técnicas impossibilitaram a correta detecção e quantificação de patógenos periodontais importantes no biofilme subgengival. A necessidade de condições rigorosas para o crescimento de algumas espécies (como *T. forsythia*, por exemplo) e as dificuldades no crescimento de espécies presentes em quantidades reduzidas nas amostras de placa, são exemplos de fatores que limitam a capacidade diagnóstica das técnicas de cultura. Além disso, as técnicas de cultura são demoradas e trabalhosas, o que dificulta a análise de um maior número de amostras clínicas (Tanner et al., 1986; Haffajee; Socransky, 1994; Chen; Slots, 1999; Sakamoto et al., 2002; Kumar et al., 2003; Loomer, 2004; Sanz et al., 2004; Sakamoto et al., 2005).

Devida a essas dificuldades no cultivo e na identificação dos microrganismos através dos meios tradicionais de cultura, no final da década de 80 e decorrer da década de 90, novas tecnologias cultura-independentes foram desenvolvidas e empregadas para suprir estas deficiências (Chen; Slots, 1999; Kumar et al., 2003; Loomer, 2004; Sanz et al., 2004; Sakamoto et al., 2005). Métodos imunodiagnósticos e enzimáticos foram empregados em estudos periodontais (Slots, 1986; Simonson et al., 1988; Christersson et al., 1989; Christersson et al., 1992; Wolff et al., 1993; Grossi et al., 1994). Os avanços da ciência na área da biologia molecular levaram ao desenvolvimento de técnicas de detecção mais específicas como as sondas de DNA (Savitt et al., 1988; Goodson et al., 1991; Haffajee et al., 1991, 1992; Socransky et al., 1991; Lotufo et al., 1994; Tanner et al., 1998) e a Reação em Cadeia da polimerase (PCR) (Saiki et al., 1985; Slots et al., 1995; Ashimoto et al., 1996; Griffen et al., 1998; Contreras et al., 2000; Doan et al., 2000; Mullally et al., 2000; Paster et al., 2001; Ávila-Campos; Velásquez-Meléndez, 2002; Ghayoumi et al., 2002; Ferraro et al., 2007).

Ashimoto et al. (1996), utilizaram o método da PCR para determinar a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus* (*B. forsythus*), *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*) e *T. denticola* em amostras subgengivais de 50 indivíduos com

Periodontite do Adulto avançada, 50 indivíduos adultos com Gengivite e 50 crianças com Gengivite. A detecção através da PCR também foi comparada à detecção através de cultura para 6 espécies bacterianas e de sondas de DNA para *P. gingivalis* e *B. forsythus*, nas amostras de Periodontite do Adulto. Para a PCR nenhuma reação cruzada com outros microrganismos ou ampliações de diferentes tamanhos de bandas foram observadas. A PCR demonstrou ser um método mais sensível do que a cultura e apresentou menores possibilidades de reações cruzadas que a detecção por sondas de DNA. A detecção das espécies analisadas pela PCR, com exceção de *C. rectus* e *E. corrodens*, foi significativamente maior no grupo dos indivíduos com Periodontite do que nos outros dois grupos. A frequência de detecção, pela PCR, em indivíduos adultos com Periodontite e Gengivite foi de 30% e 14% para *A. actinomycetemcomitans*, 86% e 18% para *B. forsythus*, 74% e 52% para *C. rectus*, 80% e 70% para *E. corrodens*, 70% e 10% para *P. gingivalis*, 58% e 12% para *P. intermédia*, 52% e 20% para *P. nigrescens* e 54% e 16% para *T. denticola*, respectivamente. Esse resultado sugeriu uma forte associação das espécies *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. denticola* com a Periodontite do adulto avançada.

A partir da avaliação dos resultados de uma grande quantidade de estudos que comprovassem a presença dos critérios sugeridos por Socransky (1979) para as espécies bacterianas, Haffajee e Socransky (1994) sugeriram uma classificação dos suspeitos patógenos periodontais de acordo como o grau de associação desses microrganismos com a etiologia das doenças periodontais. Entre as diversas espécies bacterianas detectadas na microbiota subgengival, somente *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* apresentaram um grau de associação “muito forte”, por apresentarem evidências científicas significativas em relação ao início e a progressão das doenças periodontais. Para os casos de Gengivite Ulcerativa Necrosante Aguda as espiroquetas foram consideradas os principais microrganismos envolvidos na etiologia dessas lesões. Um segundo grupo de microrganismos como *B. forsythus*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. nodatum* e *Treponema sp*, foram considerados fortes candidatos para agentes etiológicos da destruição periodontal. Outros microrganismos foram considerados como possíveis agentes etiológicos, por apresentarem um menor número de evidências científicas, apresentando graus de associação considerados como moderado ou em fase inicial de investigação.

Em 1996, na conferência mundial em Periodontia, da Academia Americana de Periodontia, pesquisadores utilizaram uma abordagem baseada em evidências científicas para definir a lista dos patógenos periodontais, tendo como base principal os critérios sugeridos por Socransky (1979). Três espécies bacterianas foram consideradas como “verdadeiros agentes etiológicos” por apresentarem evidências científicas suficientemente fortes quanto aos seus papéis na etiologia das doenças periodontais: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *B. forsythus*. Moderada evidência foi encontrada para o papel etiológico na doença periodontal de *C. rectus*, *E. nodatum*, *F. nucleatum*, *P. intermédia / nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *T. denticola* e espiroquetas para os casos de Gengivite Ulcerativa Necrosante Aguda. *A. actinomycetemcomitans* foi considerado o principal agente etiológico das Periodontites de Incidência Precoce e sua presença em indivíduos jovens foi considerada como um indicador de risco para o desenvolvimento da doença periodontal nesses indivíduos. *P. gingivalis* e *B. forsythus*, foram considerados como importantes agentes etiológicos da Periodontite do Adulto (American Academy of Periodontology, 1996).

Socransky et al. (1998), utilizando a técnica de *checkerboard DNA-DNA hybridization* (ensaio de hibridização com sondas de DNA marcadas com digoxigenina) descreveram a presença de cinco complexos microbianos em 13261 amostras de placa subgingival de 185 indivíduos adultos, 25 considerados saudáveis periodontalmente e 160 com evidências de perda de inserção. A média de idade dos indivíduos foi de 51 anos, as médias das profundidades de sondagens foram de 3,1 mm e dos níveis de inserção 2,9 mm. Foram analisadas as prevalências de 40 espécies bacterianas, as interações entre essas espécies e a relação com os parâmetros clínicos de inflamação. Os cinco complexos microbianos formados foram o resultado do agrupamento das espécies bacterianas detectadas freqüentemente associadas. O complexo “vermelho” foi composto pelas espécies *B. forsythus*, *P. gingivalis* e *T. denticola*. O complexo “laranja” foi composto por diversas subespécies de *Fusobacterium nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *C. rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *E. nodatum* e *Streptococcus constellatus*. O complexo “verde” foi composto por três espécies de *Capnocytophaga*, *Compylobacter concisus*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a. O complexo “amarelo” foi composto por diversas espécies de *estreptococos*. O complexo “roxo” foi composto por *Actinomyces*

odontolyticus e *Veillonella parvula*. *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b, *Selenomonas noxia* e *Actinomyces viscosus* não se agregaram com outras espécies bacterianas. O complexo “vermelho” foi fortemente relacionado com o aumento da profundidade de sondagem e do sangramento à sondagem. O complexo “laranja” parece preceder a colonização do complexo “vermelho” e seus constituintes são considerados possíveis patógenos periodontais. Os complexos “amarelo”, “verde” e “roxo” demonstraram associação entre si, mas menor com os outros dois complexos, e são compostos, em sua maioria, por espécies consideradas benéficas. *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b mostrou-se fracamente relacionado aos membros dos complexos vermelho e laranja.

Em 1999, a Academia Americana de Periodontia, na conferência internacional para a classificação das doenças e condições periodontais, propôs uma revisão da classificação em vigor desde 1989. Um grupo de doenças gengivais, subdividido em doenças gengivais induzidas por placa bacteriana e doenças gengivais não induzidas por placa bacteriana, foi incluído na nova classificação. A denominação “Periodontite do Adulto” também foi discutida, pois a natureza idade-dependente dessa designação não caracterizava corretamente esse tipo de perda de inserção periodontal, que passou a ser chamada de Periodontite Crônica. Uma microbiota com composição variável e o aumento da prevalência e severidade, com o aumento da idade, foram características atribuídas a essa forma de doença periodontal. A denominação “Periodontite Agressiva” foi proposta para substituir o termo “Periodontite de Incidência Precoce”. Proporções elevadas de *A. actinomycetemcomitans* e, em algumas populações de *P. gingivalis*, foram associadas à microbiota subgengival da Periodontite Agressiva (Tonetti; Mombelli, 1999).

Os estudos microbiológicos realizados durante as décadas de 80 e 90, baseados em diferentes técnicas de detecção, apesar de terem identificado mais de 400 espécies bacterianas no interior das bolsas periodontais, forneceram resultados suficientes para indicar apenas um limitado conjunto de espécies como possíveis agentes etiológicos das doenças periodontais destrutivas (Haffajee; Socransky, 1994; Moore; Moore, 1994; Socransky; Haffajee, 1994; American Academy of Periodontology, 1996; Zambon, 1996; Page et al., 1997; Socransky et al., 1998; Chen; Slots, 1999; Paster et al., 2001).

Antes da disponibilidade de métodos de detecção baseados no DNA bacteriano, as investigações da composição da microbiota subgengival estavam limitadas às espécies que podiam ser cultivadas. No entanto, principalmente a partir da aplicação de técnicas moleculares que possibilitaram a análise da ampla diversidade da microbiota subgengival, a lista de microrganismos candidatos a patógenos periodontais tornou-se consideravelmente maior. Novas espécies bacterianas, previamente não identificadas pelos estudos de cultura, foram detectadas em amostras de placa bacteriana subgengival e começaram a ser investigadas e associadas com a etiologia das doenças periodontais, através da aplicação dos dois primeiros critérios de Socransky para patogenicidade (associação com a doença e eliminação ou supressão do microrganismo) (Paster et al., 2001; Conrads, 2002; Kumar et al., 2003; Loomer, 2004; Sanz et al., 2004; Aas et al., 2005; Paster et al., 2006; Teles et al., 2006; Faveri et al., 2008; Riep et al., 2009; Armitage, 2010).

No empenho de caracterizar a diversidade bacteriana da placa subgengival humana, Paster et al. (2001) utilizaram métodos moleculares cultura-independentes para obter as seqüência do gene 16S rRNA de todas as espécies bacterianas orais, previamente cultivadas e ainda não cultivadas. Placa subgengival de indivíduos com Periodontite do Adulto (n=9), com Periodontite Refratária (n=11), com Gengivite Ulcerativa Necrozante Aguda (n=4), com doença periodontal associada ao vírus da imunodeficiência humana (n=2) e de indivíduos saudáveis (n=5), foram analisadas. A partir da extração do DNA das amostras de placa bacteriana, foi realizada a PCR para a amplificação do DNA ribossômico 16S, clonagem com *Escherichia coli* e seqüenciamento. As seqüências obtidas foram comparadas àquelas de espécies conhecidas. Com base nessa avaliação, foram detectadas 347 espécies bacterianas na microbiota subgengival, sendo que os autores estimaram a existência de mais 68 espécies adicionais totalizando, dessa maneira, cerca de 415 espécies subgengivais. Se outras superfícies orais, como mucosa jugal, língua e dentes, forem incluídas, cerca de aproximadamente 500 espécies podem ser detectadas na cavidade oral.

Além da identificação de um grande número de novas espécies bacterianas no biofilme subgengival, a aplicação das técnicas de biologia molecular também possibilitou um melhor entendimento do papel etiológico de espécies bacterianas previamente identificadas, cuja associação com as doenças periodontais ainda não

havia sido totalmente esclarecida devida as dificuldades de crescimento nos meios de cultura.

Uma espécie que começou a ser associada com as doenças periodontais foi *D. pneumosintes* (Contreras et al., 2000; Doan et al., 2000; Paster et al., 2001; Ghayoumi et al., 2002; Hutter et al., 2003; Ferraro et al., 2007). O interesse por esse microrganismo parece ter sido iniciado a partir dos estudos de um mesmo grupo de pesquisadores (Contreras et al., 2000; Doan et al., 2000) que justificaram a importância da relação dessa bactéria com a perda de inserção periodontal a partir dos achados de Moore et al. (1982b) e Moore e Moore (1994).

Poucos estudos investigaram a ocorrência de *D. pneumosintes*, através de cultura, na doença periodontal. *D. pneumosintes* foi detectada por cultura em indivíduos com gengivite e em adultos com periodontite (Moore et al., 1982b; Moore; Moore, 1994), mas apenas em baixas proporções em relação ao total de microrganismos isolados nas amostras de placa subgengival.

Por causa do crescimento lento do microrganismo *D. pneumosintes*, das dificuldades de distingui-lo da espécie *Eubacterium* e da necessidade de condições de anaerobiose, é possível que os estudos de cultura tenham falhado na detecção e/ou subestimado a ocorrência subgengival dessa bactéria (Moore; Moore, 1994; Doan et al., 2000; Ferraro et al., 2007). Estudos subsequentes utilizando técnicas moleculares relataram altas frequências de detecção de *D. pneumosintes* em sítios com destruição periodontal avançada (Contreras et al., 2000; Doan et al., 2000; Ghayoumi et al., 2002; Hutter et al., 2003; Nonnenmacher et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2005; Gomes et al., 2006; Ferraro et al., 2007).

Contreras et al. (2000), avaliaram a ocorrência subgengival de *D. Pneumosintes* em 135 pacientes com vários graus de doença periodontal, através da PCR. *D. pneumosintes* foi detectada em 83% das amostras de placa bacteriana de indivíduos com Periodontite Crônica avançada, em 32% das amostras de indivíduos com Periodontite Crônica moderada, em 19% das amostras de indivíduos com Periodontite Crônica leve e em somente 17% das amostras de indivíduos com Gengivite. Devida à alta prevalência de *D. pneumosintes* em lesões periodontais avançadas, os autores sugeriram a inclusão dessa bactéria no grupo dos suspeitos patógenos periodontais.

2.2 Quantificação de bactérias pela PCR em tempo real

Dentre os métodos utilizados para a detecção de microrganismos, a PCR representa o método mais sensível e específico para determinar a presença de bactérias periodontais (Slots et al., 1995; Ashimoto et al., 1996; Griffen et al., 1998; Doan et al., 2000; Conrads, 2002; Maeda et al., 2003; Sanz et al., 2004), sendo a técnica de amplificação de ácido nucléico mais comumente utilizada para o diagnóstico de doenças infecciosas (Mackay, 2004). A ausência de reações cruzadas com outros microrganismos e o limite de detecção, são vantagens desse método que podem ser obtidas em condições de amplificação otimizadas (Chen; Slots, 1999; Sanz et al., 2004). No entanto, o método convencional da PCR apenas determina a presença ou ausência do microrganismo alvo, não sendo capaz de quantificar os números absolutos das bactérias presentes nas amostras clínicas (Chen; Slots, 1999; Sakamoto et al., 2001; Nonnenmacher et al., 2004; Sanz et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Nonnenmacher et al., 2005; Sakamoto et al., 2005; Kubista et al., 2006).

Chen e Slots (1999) sugeriram, nas conclusões de um artigo sobre testes microbiológicos para *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, que o desenvolvimento de uma técnica de PCR quantitativa poderia melhorar ainda mais a utilização da PCR para a detecção de patógenos nas doenças periodontais.

Em 1992 foi desenvolvida uma variação da técnica convencional da PCR, a chamada PCR em tempo real (Higuchi et al., 1992). A PCR em tempo real é uma técnica que vem ganhando espaço nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de quantificar fragmentos de ácidos nucleicos (DNA e RNA) de maneira mais sensível, específica e com maior reprodutibilidade, comparada a outras técnicas quantitativas (Heid et al., 1996; Lyons et al., 2000; Sakamoto et al., 2001; Maeda et al., 2003; Loomer, 2004; Nonnenmacher et al., 2004; Sanz et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Nonnenmacher et al., 2005; Sakamoto et al., 2005; Boutaga et al., 2006; Kubista et al., 2006).

Em relação à PCR “convencional”, a PCR em tempo real, além de ser um método de detecção mais sensível, apresenta as vantagens de possibilitar uma visualização em tempo real dos produtos amplificados, determinar a quantificação absoluta do número de células bacterianas alvo e representar uma análise mais

rápida, sem a necessidade de um processamento pós - PCR, evitando assim possíveis contaminações com brometo de etídio (Nonnenmacher et al., 2004; Sanz et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2005; Houghton; Cockerill, 2006).

A aplicação da PCR em tempo real na área da microbiologia tem sido extremamente útil para o estudo de agentes microbianos em doenças infecciosas, ajudando a esclarecer os processos de doença (Mackay, 2004; Kubista et al., 2006).

A PCR em tempo real é baseada na detecção e no monitoramento contínuo de um sinal fluorescente que é proporcional a quantidade de produtos formados após cada ciclo de amplificação (Sanz et al., 2004; Houghton; Cockerill, 2006). A tecnologia TaqMan® utiliza uma sonda fluorogênica (sonda TaqMan®) para detectar seqüências específicas de nucleotídeos nos fragmentos de DNA amplificados pela PCR em tempo real. A sonda TaqMan® é uma seqüência de oligonucleotídeos marcada nas extremidades 5' e 3' com corantes distintos, *reporter* e *quencher*, respectivamente. Enquanto a sonda permanece intacta, a proximidade entre as duas moléculas faz com que a fluorescência emitida pelo *reporter* seja transferida e absorvida pelo *quencher*, não havendo emissão de fluorescência detectável pelo equipamento (Didenko, 2001; Mackay, 2004; Houghton; Cockerill, 2006). Durante a PCR em tempo real, os iniciadores (*primers*) e a sonda TaqMan® hibridizam com a seqüência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo de extensão dos primers, a sonda é degradada devido à atividade exonuclease 5'-3' da enzima *Taq DNA polimerase*. A clivagem da sonda leva à separação do *reporter* da ação inibitória do *quencher*, gerando uma emissão de fluorescência pelo *reporter*, que é então detectada pelo equipamento. O número do ciclo da reação em que começa a ocorrer a detecção dessa fluorescência pelo equipamento é chamado de ciclo limiar (*Cycle Threshold – CT*), e o seu valor é proporcional ao número de cópias da seqüência alvo. Sendo assim, a PCR em tempo real determina os valores quantitativos através da monitorização da fase exponencial da reação de amplificação, onde a fluorescência gerada é proporcional à quantidade de produtos amplificados pela PCR a cada ciclo (Heid et al., 1996; Mackay, 2004; Sanz et al., 2004; Sakamoto et al., 2005; Houghton; Cockerill, 2006; Kubista et al., 2006).

A quantificação da fluorescência gerada pela reação é possível através da comparação do valor do CT obtido com a amplificação da amostra clínica, com os valores dos CTs obtidos por concentrações conhecidas do DNA alvo (curva padrão).

A curva padrão é obtida através da amplificação de diferentes concentrações, geradas a partir de diluições seriadas de 10 vezes, de uma quantidade conhecida de DNA alvo. Os valores dos CTs gerados por cada uma dessas diluições são plotados contra o logaritmo das concentrações padrões e são utilizados como referências para a quantificação das amostras clínicas (Heid et al., 1996; Mackay, 2004; Sanz et al., 2004; Kubista et al., 2006).

Tanto os iniciadores como a sonda TaqMan[®] utilizados pela PCR em tempo real são espécie-específicos, ou seja, são seqüência de nucleotídeos complementares a regiões altamente conservadas do DNA de um determinado gene de cada espécie bacteriana (Conrads, 2002; Maeda et al., 2003). O gene 16S rRNA é amplamente utilizado nos estudos da PCR para o delineamento de iniciadores e sondas pois apresenta regiões altamente conservadas dentro de cada espécie bacteriana. Essa especificidade possibilita a identificação de microrganismos sem a ocorrência de reações cruzadas, sendo importante também para a detecção de espécies que não podem ser cultivadas ou facilmente distinguidas pela cultura (Slots et al., 1995; Ashimoto et al., 1996; Conrads, 2002; Boutaga et al., 2003; Maeda et al., 2003; Nonnenmacher et al., 2004; Sakamoto et al., 2005).

Os primeiros estudos microbiológicos na área da periodontia envolvendo a aplicação da PCR em tempo real testaram a confiabilidade do método, para a detecção e quantificação das principais espécies consideradas periodontopatogênicas, através da avaliação da especificidade e da sensibilidade dos iniciadores e das sondas delineados para esses ensaios. A comparação dessa tecnologia de biologia molecular com a cultura, considerada o método de diagnóstico “padrão-ouro” em microbiologia periodontal, também foi realizada demonstrando uma boa concordância diagnóstica entre os dois métodos, com vantagens para a PCR (Sakamoto et al., 2001; Boutaga et al., 2003, 2006; Lau et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005). Esses estudos mostraram que a PCR em tempo real é um método preciso e sensível para a detecção e quantificação das espécies bacterianas testadas, bem como para a quantificação do total de bactérias das amostras analisadas, sendo uma ferramenta útil para estudos sobre a etiologia das doenças periodontais (Lyons et al., 2000; Shelburne et al., 2000; Sakamoto et al., 2001; Asai et al., 2002; Maeda et al., 2003; Yoshida et al., 2003; Morillo et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Nonnenmacher et al., 2005; Boutaga et al., 2006).

A quantificação das cargas bacterianas pode levar a uma melhor compreensão sobre o papel etiológico das espécies bacterianas nas doenças periodontais (Chen; Slots, 1999; Sanz et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2005).

Vários estudos têm relatado a utilidade da técnica da PCR em tempo real para a detecção e quantificação de alguns patógenos periodontais como:

- *P. gingivalis* (Lyons et al., 2000; Sakamoto et al., 2001; Boutaga et al., 2003, 2006; Maeda et al., 2003; Yoshida et al., 2003; Kawada et al., 2004; Lau et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Boutaga et al., 2006; Gomes et al., 2006; Mineoka et al., 2008; Del Peloso Ribeiro et al., 2008);

- *A. actinomycetemcomitans* (Sakamoto et al., 2001; Boutaga et al., 2003, 2005; Maeda et al., 2003; Yoshida et al., 2003; Lau et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Nonnenmacher et al., 2005; Boutaga et al., 2006; Gomes et al., 2006; Del Peloso Ribeiro et al., 2008);

- *T. denticola* (Sakamoto et al., 2001; Asai et al., 2002; Yoshida et al., 2004; Mineoka et al., 2008);

- *T. forsythia* (Shelburne et al., 2000; Sakamoto et al., 2001; Lau et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Boutaga et al., 2005; 2006; Jervøe-Storm et al., 2005; Boutaga et al., 2006; Mineoka et al., 2008; Del Peloso Ribeiro et al., 2008) e

- *D. pneumosintes* (Nonnenmacher et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2005; Gomes et al., 2006).

Desses estudos, apenas alguns utilizaram a tecnologia TaqMan® para a quantificação absoluta de periodontopatógenos (Asai et al., 2002; Boutaga et al., 2003; Lau et al., 2004; Yoshida et al., 2004; Kawada et al., 2004; Lau et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Nonnenmacher et al., 2005; Boutaga et al., 2006; Gomes et al., 2006; Mineoka et al., 2008), enquanto outros utilizaram a tecnologia SYBR®-Green, considerada menos específica e sensível (Sakamoto et al., 2001; Maeda et al., 2003; Houghton; Cockerill, 2006; Del Peloso Ribeiro et al., 2008; Byrne et al., 2009; Abiko et al., 2010; Braga et al., 2010).

Um método da PCR em tempo real para a quantificação de cinco periodontopatógenos (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *D. pneumosintes* e *Micromonas micros*), assim como para o número total de bactérias, em amostras de placa bacteriana subgengival de 33 indivíduos periodontalmente saudáveis e de 50 com periodontite, foi apresentado por Nonnenmacher et al.

(2004). Foram utilizados iniciadores e sondas TaqMan®, delineados com base em seqüências específicas do gene 16S rRNA, para cada uma das espécies bacterianas avaliadas. Curvas padrão para os cinco periodontopatógenos e para o total de bactérias foram construídas a partir de diluições seriadas de cópias de plasmídeos (10^1 a 10^8), obtidas por clonagem, e utilizadas para a quantificação do genoma bacteriano nas amostras subgengivais. A sensibilidade do método revelou uma ampla quantificação variando de 10^2 a 10^8 cópias de plasmídeos. A especificidade foi comprovada pela amplificação específica dos iniciadores para cada microrganismo respectivo e ausência de amplificação com o DNA de outras espécies bacterianas. Foi observada uma carga bacteriana significativamente maior nos indivíduos com periodontite em comparação com os indivíduos saudáveis para *A. actinomycetemcomitans* (média: $2,4 \times 10^3$ e 2×10^2), *P. gingivalis* (média: $9,3 \times 10^2$ e $<10^2$), *D. pneumosintes* (média: $5,9 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^2$) e *Micromonas micros* (média: $7,3 \times 10^3$ e $2,8 \times 10^2$). Em contraste, as quantidades subgengivais de *P. intermedia* não mostraram diferenças significantes entre os grupos. Segundo os autores, esses resultados sugerem que nem todas as bactérias consideradas patogênicas estão presentes em quantidades elevadas em pacientes com doença periodontal.

Esse mesmo grupo, em 2005 (Nonnenmacher et al., 2005), analisou a relação entre os parâmetros clínicos e as quantidades subgengivais de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *D. pneumosintes*, *C. rectus* e *Micromonas micros*, em um total de 83 amostras subgengivais provenientes de 22 indivíduos com Periodontite Agressiva (grupo A), 61 com Periodontite Crônica (grupo B) e 43 periodontalmente saudáveis (grupo C). Foi empregada a mesma metodologia do estudo de 2004 (Nonnenmacher et al., 2004) para a quantificação do genoma bacteriano nas amostras clínicas. Todas as amostras clínicas, nos três grupos, apresentaram freqüências de detecção significativamente maiores de *P. gingivalis*, *Micromonas micros*, *D. pneumosintes* e *C. rectus* em comparação com *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia*. A comparação entre os grupos A e B, quanto à presença dos microrganismos, não demonstrou diferença significativa. Em contrapartida, uma diferença significativa foi encontrada quando os indivíduos com doença periodontal (grupos A + B) foram comparados com os indivíduos do grupo C, para a presença de *P. gingivalis*, *Micromonas micros*, *D. pneumosintes* e *C. rectus*. A análise quantitativa indicou que os periodontopatógenos não foram distribuídos uniformemente entre os três grupos. Os microrganismos *P. gingivalis*, *Micromonas*

micros, *D. pneumosintes* e *C. rectus*, apresentaram quantidades significativamente maiores na Periodontite Agressiva em comparação com a Periodontite Crônica (*P. gingivalis*: $4,55 \times 10^5$ e 3×10^4 ; *Micromonas micros*: $2,45 \times 10^5$ e $7,23 \times 10^4$; *D. pneumosintes*: $5,3 \times 10^4$ e $9,3 \times 10^3$; *C. rectus*: $3,2 \times 10^3$ e $6,4 \times 10^2$, respectivamente). A correlação das cargas bacterianas com os parâmetros clínicos revelou uma correlação positiva entre a profundidade de sondagem e o sangramento à sondagem com as quantidades de *P. gingivalis*, *Micromonas micros* e *C. rectus*. Nenhuma correlação foi encontrada para *A. actinomycetemcomitans*. Segundo os autores, esses resultados mostraram que a simples presença de periodontopatógenos não necessariamente leva ao desenvolvimento da doença periodontal destrutiva, levantando a hipótese de que as cargas bacterianas precisam atingir um limite crítico para induzirem a destruição tecidual no hospedeiro.

Um estudo clínico e microbiológico com indivíduos brasileiros, portadores de doença periodontal crônica, fumantes e não fumantes, foi realizado por Gomes et al. (2006). Foi realizada avaliação microbiológica de amostras de placa bacteriana subgengival através do método quantitativo da PCR em tempo real da mesma forma que Nonnenmacher et al. (2004). Os iniciadores e sondas utilizados para identificação bacteriana de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Micromonas micros* e *D. pneumosintes*, foram baseados em seqüências específicas do gene 16S rRNA. A avaliação microbiológica inicial dos pacientes não fumantes revelou uma maior quantidade subgengival de *Micromonas micros*, seguida de *P. gingivalis*, *D. pneumosintes* e *A. actinomycetemcomitans*.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivos:

- Avaliar a presença e a quantidade subgengival das bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Dialister pneumosintes* em indivíduos com diagnóstico de Gengivite associada apenas à placa bacteriana, Periodontite Crônica e Periodontite Agressiva, utilizando a técnica da PCR em tempo real.
- Analisar a correlação entre os resultados quantitativos obtidos para cada patógeno e os parâmetros clínicos periodontais (profundidade clínica de sondagem e nível clínico de inserção).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa que originou essa dissertação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), sob o protocolo de número 01/04 (Anexo A).

4.1 Seleção da amostra

Esse estudo transversal foi realizado com uma amostra de conveniência composta por indivíduos que foram encaminhados para tratamento periodontal nas clínicas de Graduação e de Pós-Graduação, da Disciplina de Periodontia da FOUSP. A inclusão dos indivíduos nesse estudo ocorreu entre os anos de 2006 a 2009. Todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa foram informados sobre a natureza do estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

Aos indivíduos interessados em participar do estudo, foi aplicado um questionário para coleta de informações sobre a saúde geral (ficha de anamnese da Disciplina de Periodontia da FOUSP) (Anexo B). Os voluntários não tornavam-se elegíveis se apresentassem:

- a) Condição sistêmica capaz de interferir com o processo saúde-doença periodontal.
- b) Condição sistêmica que determinasse a necessidade de profilaxia antibiótica.
- c) Gravidez ou período de lactação.
- d) Hábito de Fumar.
- e) História de tratamento periodontal e/ou de antibioticoterapia nos seis meses predecessores ao exame clínico de inclusão.

Em seguida, os indivíduos elegíveis eram examinados clinicamente e incluídos no estudo se apresentassem os seguintes critérios:

- a) Presença de pelo menos 12 dentes na cavidade bucal.

- b) Diagnóstico de Gengivite associada apenas à placa bacteriana, Periodontite Crônica ou Periodontite Agressiva (American Academy of Periodontology, 1999).

Respeitando-se os critérios de inclusão e exclusão descritos acima, foi selecionado para esse estudo transversal, de forma consecutiva, um total de 176 indivíduos, sendo 71 indivíduos com diagnóstico de Gengivite associada apenas à placa bacteriana (Grupo G), 67 com diagnóstico de Periodontite Crônica (Grupo PC) e 38 com diagnóstico de Periodontite Agressiva (Grupo PA).

O diagnóstico das condições periodontais foi estabelecido através da avaliação dos dados da anamnese, dos dados clínicos (parâmetros clínicos) e dos dados radiográficos (14 radiografias periapicais), de acordo com a classificação vigente da Academia Americana de Periodontia (American Academy of Periodontology, 1999).

4.2 Registro dos parâmetros clínicos

O exame clínico consistiu no preenchimento de uma ficha periodontal (ficha de periograma da Disciplina de Periodontia da FOU SP) (Anexo C), onde foram registrados, em seis sítios por dente (mesio-vestibular, centro-vestibular, disto-vestibular, mesio-palatino/lingual, centro-palatino/lingual e disto-palatino/lingual), os seguintes parâmetros clínicos (Armitage, 2004):

- a) Distância da margem gengival à junção esmalte-cimento (MG-JEC)
- b) Profundidade clínica de sondagem (PCS)
- c) Nível clínico de inserção (NCI)
- d) Sangramento à sondagem (SS)

Essas medidas clínicas foram realizadas por um único examinador treinado, com o auxílio de uma sonda periodontal manual¹, e os valores de PCS e NCI foram arredondados para o milímetro superior mais próximo.

Os pacientes examinados foram divididos em três grupos, de acordo com o diagnóstico periodontal estabelecido:

¹ PCPUNC 15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

Grupo G - Gengivite associada apenas à placa bacteriana. Indivíduos sem evidências radiográficas de perdas ósseas, com índice de sangramento à sondagem maior que 30% e ausência de sítios com NCI > 3,0 mm.

Grupo PC - Periodontite Crônica. Presença de pelo menos um sítio por quadrante com evidência radiográfica de perda óssea, PCS $\geq$ 5,0 mm, NCI $\geq$ 5,0 mm e sangramento à sondagem.

Grupo PA - Periodontite Agressiva localizada ou generalizada. Presença de pelo menos um sítio por quadrante com evidência radiográfica de perda óssea, PCS $\geq$ 5,0 mm, NCI $\geq$ 5,0 mm e sangramento à sondagem.

4.3 Coleta das amostras clínicas

Todas as coletas microbiológicas foram realizadas pelo mesmo examinador responsável pelo registro dos parâmetros clínicos periodontais. Para cada indivíduo foram coletadas quatro amostras de placa subgengival, cada uma correspondente ao sítio com a maior PCS de cada quadrante (Mombelli et al., 1991). Os critérios de escolha dos sítios das coletas microbiológicas estão descritos na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Critérios de escolha dos sítios para coleta microbiológica

Grupo	Sítio / quadrante
Grupo G: Gengivite	Sítio proximal com a maior PCS e SS, havendo preferência por primeiros molares
Grupo PC: Periodontite Crônica	Sítio com a maior PCS e SS
Grupo PA: Periodontite Agressiva	Sítio com a maior PCS e SS, havendo preferência por primeiros molares e incisivos

Inicialmente, a área a qual pertencia o sítio selecionado foi lavada com jato de água, isolada com rolos de algodão e secada com jatos de ar. A seguir, a placa supragengival do sítio selecionado foi removida com bolinhas de algodão estéreis e curetas periodontais de Gracey².

² Curetas Gracey 5/6, 11/12, 13/14 – Hu Friedy, USA

Um cone de papel absorvente estéril³ foi introduzido no interior do sulco gengival ou da bolsa periodontal de cada sítio, e mantido em posição por 30 segundos (Hartroth et al., 1999). Os cones de papel resultantes da coleta microbiológica de cada indivíduo foram agrupados em um único tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril⁴ (*pool*). Os tubos foram adequadamente identificados e mantidos à -20°C, até o momento do processamento laboratorial das amostras.

Os indivíduos com diagnóstico de Gengivite associada apenas à placa bacteriana e Periodontite Crônica, após colaborarem com esse estudo, receberam tratamento periodontal nas clínicas de Graduação e de Pós-Graduação, da Disciplina de Periodontia da FOU SP. Os indivíduos diagnosticados com Periodontite Agressiva participaram de um ensaio clínico, pertencente a um projeto de doutorado da Disciplina de Periodontia da FOU SP, onde também foram tratados e acompanhados adequadamente.

4.4 Avaliação Microbiológica

As amostras de placa subgengival foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata.

As seguintes espécies bacterianas foram analisadas pela PCR em tempo real a fim de se determinar suas quantidades nas amostras clínicas coletadas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) e *Dialister pneumosintes* (*D. pneumosintes*).

³ Tanari, #30, SP, Brasil

⁴ Axygen Scientific, CA, USA

4.4.1 Obtenção dos controles para quantificação pela PCR em tempo real

Os controles exógenos, utilizados para a construção da curva padrão para a quantificação absoluta de cada agente infeccioso investigado, foram obtidos através do processo de clonagem, cujas etapas serão descritas a seguir e estão representadas resumidamente na figura 4.1.

Figura 4.1 - Clonagem em plasmídeo (modificado de Cooper; Hausman, 2003)

4.4.1.1 Cultura das cepas bacterianas

As cepas bacterianas, referentes a cada uma das bactérias analisadas, foram obtidas através de importação da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Tabela 4.2) e cultivadas no laboratório de microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a supervisão do Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman.

Tabela 4.2 - Cepas bacterianas

Bactéria	Cepa
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 49417
<i>Treponema denticola</i>	ATCC 33521
<i>Tannerella forsythia</i>	ATCC 43037
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	ATCC 29522
<i>Dialister pneumosintes</i>	ATCC 33048

4.4.1.2 Extração do DNA das cepas bacterianas

O conjunto de reagentes QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) foi utilizado para a extração do DNA das células bacterianas, conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. Partindo-se de 100µl de uma suspensão contendo aproximadamente 10^6 células/ml, adicionou-se 20µl de proteinase K e 200µl de solução tampão (buffer AL), presentes no kit de extração. Os microtubos foram então encubados a 56°C, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 300µl de etanol e iniciou-se um ciclo de repetidas centrifugações e adições de solução tampão. Ao final, o DNA extraído ficou eluído em solução tampão.

4.4.1.3 Ensaio da PCR para amplificação dos fragmentos do genoma das bactérias

Regiões altamente conservadas do gene 16S rRNA das bactérias *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* e *D. pneumosintes* foram amplificadas pela PCR com o uso de iniciadores (*primers*) específicos para cada uma das cepas bacterianas.

Os iniciadores foram desenhados baseados nas regiões espécie-específicas altamente conservadas do gene 16S rRNA, através do uso do programa *Primer ExpressTM* (Applied Biosystems, Foster City, CA). As seqüências desses iniciadores e os números de acesso dos genes de acordo com o banco de dados *GenBank®* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), podem ser vistos na tabela 4.3. As especificidades dos iniciadores foram confirmadas empregando-se o programa *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* do *National Center for Biotechnology Information Server* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Altschul et al., 1990).

Tabela 4.3 - Iniciadores utilizados na PCR

Iniciadores	Seqüência (5' - 3')	No. Acesso
<i>P. gingivalis</i>		
Senso	ACCTTACCCGGGATTGAAATG	AF118634
Anti-senso	CAACCATGCAGCACCTACATAGAA	
<i>T. denticola</i>		
Senso	CCGAATGTGCTCTACATAAAGGT	AJ277354
Anti-senso	GATACCACTCGTTGCCTTGGT	
<i>T. forsythia</i>		
Senso	AGCGATGGTAGCAATACCTGT	AM039448
Anti-senso	TTCGCCGGGTTATCCCTC	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		
Senso	TCCCCTCTCTACTTCTCTTGCTTATTAC	M75039
Anti-senso	GGCAACGGTAGAAGGGTGATT	
<i>D. pneumosintes</i>		
Senso	GAGGGGTTTGC GACTGATTA	X82500
Anti-senso	CCGTCAGACTTTCGTCCATT	

Para o ensaio da PCR, as reações foram realizadas utilizando-se 2µl de DNA das cepas bacterianas, iniciadores senso e anti-senso 200 nM (Prodinol Biotecnologia, Belo Horizonte, MG, Brasil), dNTP 800 nM (Amersham Biosciences, Piscataway/NJ, EUA), DNA polimerase 1U (Biotools, Madri, Espanha), tampão de PCR 1x (Tris-HCl 75 mM, pH 9,0; KCl 50 mM; (NH₄)₂SO₄ 20 mM), MgCl₂ 2 mM e água deionizada estéril para um volume final de 50 µl.

A PCR foi realizada no termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), utilizando-se o seguinte programa: desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto para hibridização, 72°C por 1 minuto para extensão e etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos gerados pela PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (Sambrook; Russel, 2001). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV), após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL), e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA) (exemplo na Figura 4.2).

Figura 4.2 - Gel do produto de amplificação da bactéria *P. gingivalis*

4.4.1.4 Purificação dos produtos da PCR para clonagem

A purificação dos produtos amplificados pela PCR, contendo o material genômico das diferentes cepas bacterianas, foi realizada recortando-se os fragmentos identificados no gel de agarose utilizando o sistema comercial GFX Genomic DNA kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante.

4.4.1.5 Reação de ligação dos fragmentos dos genes obtidos pela PCR com o plasmídeo

O fragmento de gene amplificado pela PCR dos agentes infecciosos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* e *D. pneumosintes*, e o plasmídeo pGEM®-T Easy Vector (pGEM®-T Easy Vector System I, Promega, Wisconsin, USA) foram submetidos à reação de ligação (clonagem), conforme as orientações do fabricante. O produto desta reação foi utilizado para transformação de *Escherichia coli* (*E. coli*), cepa *DH-5α*. Os plasmídeos recombinantes foram denominados: pGem::16S rRNA Aa, pGem::16S rRNA Pg, pGem::16S rRNA Td, pGem::16S rRNA Tf e pGem::16S rRNA Dp.

4.4.1.6 Preparação das bactérias competentes

A partir de uma colônia isolada da bactéria *E. coli DH-5α*, foi realizado repique para a expansão utilizando-se meio de cultura LB líquido sem antibiótico e incubando-se sob agitação a 37°C, até a obtenção de uma densidade óptica de 600 nm. A suspensão resultante foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e as células decantadas. Em seguida, o material foi tratado com solução de CaCl₂ 50 mM por 30 minutos e centrifugado a 4000g durante 5 minutos. As células foram novamente ressuspensas em solução de CaCl₂ 50 mM e 5% de DMSO, e conservadas a -70°C até o momento da transformação (Sambrook; Russel, 2001).

4.4.1.7 Transformação da *E. coli* com o plasmídeo recombinante

Para a transformação foram utilizados 50 µl de suspensão de bactérias *E. coli* (células competentes) e 2 µl de produto da reação de ligação (plasmídeo recombinante). A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 minutos em banho de gelo, por 50 segundos a 42°C sem agitação e, novamente, em banho de gelo por mais 2 minutos. Foi adicionado 950 µl de meio SOC e incubado a 37°C por 90 minutos com agitação. O produto de transformação (*E. coli* recombinante) foi semeado em meio de cultura LB ágar contendo ampicilina (100 µg/ml) com incubação a 37°C por uma noite (Sambrook; Russel, 2001).

4.4.1.8 Extração do DNA plasmidial

Partindo-se de uma colônia de *E. coli* isolada e carreadora do plasmídeo pGEM®-T Easy Vector contendo o inserto (*E. coli* recombinante), foi realizada a incubação em 5 ml de meio de cultura LB líquido com antibiótico (100 µg/ml), por uma noite, a 37°C com agitação. As colônias foram centrifugadas a 5000g por 5 minutos, 4 ml do sobrenadante foram removidos e o restante resuspenso e transferido para um microtubo de 1,5 ml estéril. O microtubo foi centrifugado a 12000g por 5 minutos e o sobrenadante removido. O sedimento foi utilizado para extração dos plasmídeos recombinantes, de acordo com o protocolo de orientação do kit de extração GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences).

Aproximadamente 5 µl da solução contendo o plasmídeo recombinante foram submetidas à restrição enzimática e analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, para confirmação da presença do fragmento clonado (Sambrook; Russel, 2001).

4.4.1.9 Análise do controle exógeno para quantificação do número de cópias do genoma bacteriano

Um total de 1 µl da solução contendo o plasmídeo recombinante foi quantificado por espectrofotometria em UV (aparelho: NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA).

A partir da massa molecular do plasmídeo recombinante, obtida através do programa *Oligo Calculator* (<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>), e de sua quantificação por espectrofotometria, foram determinados os números de cópias do genoma de cada bactéria-alvo através da fórmula:

$$(Y \times 6,02 \times 10^4) / Z$$

onde Y é o valor da quantificação por espectrofotometria e Z é o valor da massa molecular do plasmídeo recombinante (Skipper et al., 2006).

Diluições seriadas (10^1 a 10^{10}) de concentrações conhecidas foram realizadas para cada um dos plasmídeos recombinantes. Essas diluições foram processadas pela PCR em tempo real para obtenção da curva padrão utilizada como parâmetro para a quantificação do número de bactérias alvo presentes nas amostras clínicas.

Uma vez determinados os limites de quantificação, todas as amostras foram amplificadas pela PCR em tempo real juntamente com a curva padrão respectiva de cada espécie bacteriana, em triplicatas.

4.4.2 Extração de DNA das amostras clínicas

O conjunto de reagentes QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) foi utilizado para a extração do DNA presente nas amostras clínicas, seguindo-se as orientações do fabricante.

No entanto, estabelecemos um preparo inicial das amostras, a fim de se melhorar a qualidade da extração do material genético presente nos cones de papel absorvente utilizados para a coleta do biofilme subgengival. Esse preparo constituiu em se adicionar 200µl de solução tampão PBS aos cones de papel, que foram esmagados até ficarem completamente submersos. Os microtubos foram então mantidos sob agitação por 12 horas.

Após esse preparo inicial, foi adicionado aos microtubos 20µl de proteinase K e 200µl de solução tampão (buffer AL), presentes no kit de extração. Os microtubos foram então encubados a 56°C, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 300µl de etanol e iniciou-se um ciclo de repetidas centrifugações e adições de solução tampão, conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. Ao final, o DNA extraído ficou eluído em solução tampão.

A quantificação do DNA genômico extraído das amostras clínicas foi determinada por espectrofotometria a 260 nm e sua pureza pela razão de absorbância A260/A280, através do aparelho NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA), utilizando-se uma alíquota da

solução de cada amostra de DNA. O valor considerado ideal para a pureza dos extratos de DNA foi de 1,8 a 2,0 (Sambrook; Russel, 2001).

4.4.3 Realização da PCR em tempo real

A identificação e a quantificação absoluta das bactérias *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* e *D. pneumosintes* nas amostras clínicas, foram realizadas através da PCR em tempo real, utilizando-se o sistema de amplificação com sondas TaqMan® e detecção pelo equipamento ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA,EUA).

A PCR em tempo real foi realizada utilizando uma solução de 25µl contendo 0,5µl de 200 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,5µl de 200 nM de sonda TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA,EUA), 12,5µl de Taqman® Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA,EUA), 9µl de água estéril e 2µl de solução de DNA. A reação de amplificação foi realizada com as seguintes etapas: temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos e amplificação por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

As sondas TaqMan® para as bactérias analisadas também foram desenhadas baseadas nas regiões espécie-específicas altamente conservadas do gene 16S rRNA, com o auxílio do programa *Primer Express™* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e as especificidades foram confirmadas empregando-se o programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) do *National Center for Biotechnology Information Server* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Altschul et al., 1990).

As seqüências das sondas, com os respectivos marcadores nas extremidades 5'(repórter) e 3'(quencher), estão descritas na tabela 4.4. As seqüências dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real estão listadas na tabela 4.3.

Tabela 4.4 - Sondas TaqMan® utilizadas na PCR em tempo real

Bactérias	Sonda TaqMan® (5'-3')
<i>P. gingivalis</i>	VIC/ATGACTGATGATGGTGAAAACCGTCTTCCCTTC/NFQ-MGB

<i>T. denticola</i>	Cy5/TGAGTAACGCGTATGTAACCTGCCCCGC/3labRQSp
<i>T. forsythia</i>	FAM/CCGCGACGTGAAATGGTATTCTC/NFQ-MGB
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	FAM/CACTTAAAGGTCCGCCTACGTGCC/NFQ-MGB
<i>D. pneumosintes</i>	FAM/CACCAAGCCGACGATCAGTAGCCG/NFQ-MGB

VIC[®]: fluoróforo repórter; NFQ: non-fluorescent quencher; MGB[™]: Minor Groove Binder; Cy5[™]: Cyanine 5; 3labRQSp: Iowa back RQ[™]-Sp; FAM[™]: fluoróforo repórter

Diluições seriadas dos plasmídeos recombinantes foram processadas pela PCR em tempo real, utilizando-se os iniciadores e as sondas descritas para cada microrganismo, para formação da curva padrão de cada bactéria alvo. O limite mínimo de quantificação para *A. Actinomycetemcomitans* (Figura 4.3) e *T. denticola* (Figura 4.6) foi de 1000 cópias, enquanto que para *P. gingivalis* (Figura 4.4), *T. forsythia* (Figura 4.5) e *D. pneumosintes* (Figura 4.7) foi de 100 cópias. Um limite máximo de quantificação de 10⁹ cópias foi estabelecido para todas as bactérias.

Uma vez determinados os limites de quantificação, as amostras clínicas foram processadas juntamente com os controles, em triplicatas, e os valores médios foram utilizados para o cálculo dos níveis bacterianos. Aproximadamente 3200 reações foram realizadas, sempre respeitando-se uma eficiência da reação de amplificação para a curva padrão entre 110% a 93% (*slope* = -3,10 a -3,50) e um coeficiente de correlação (*R*²) ≥ 0,98. Segundo Livak e Schmittgen (2001), para o ensaio da PCR em tempo real ter alta eficiência (90 a 110%) a inclinação da curva padrão (*slope*) deve ser próxima de -3,3.

As diluições das cópias dos plasmídeos serviram como controle positivo para as reações de amplificação e como controle negativo o DNA foi substituído pela mesma quantidade de água estéril, a fim de se checar possíveis contaminações.

Figura 4.3 – Curva padrão da bactéria *A. Actinomycetemcomitans* ($R^2 = 0,997$; Slope = -3,23)

Figura 4.4 - Curva padrão da bactéria *P. gingivalis* ($R^2 = 0,999$; Slope = -3,10)

Figura 4.5 – Curva padrão da bactéria *T. forsythia* ($R^2 = 0,995$; Slope = -3,23)

Figura 4.6 - Curva padrão da bactéria *T. denticola* ($R^2 = 0,997$; Slope = -3,42)

Figura 4.7 – Curva padrão da bactéria *D. pneumosintes* ($R^2 = 0,999$; Slope = -3,45)

4.5 Análise estatística

Foram calculadas as médias e desvio-padrão das variáveis contínuas (idade dos participantes, número de dentes presentes, MG-JEC, PCS, NCI, SS e quantidades das bactérias avaliadas). Os três grupos (G, PC e PA) foram comparados com relação às médias das variáveis contínuas por meio do teste ANOVA a um fator. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio do teste *post-hoc* de Bonferroni.

As associações entre a variável sexo e grupo (G, PC e PA) e entre presença das bactérias e grupo (G, PC e PA) foram verificadas por meio do teste de qui-quadrado. Posteriormente, os grupos PC e PA foram agrupados no grupo P (periodontite), e foi verificada a existência de associação entre grupo e presença das bactérias.

Também verificou-se se havia correlação entre variáveis clínicas contínuas (PCS e NCI) e o número de bactérias quantificadas, por meio do teste de correlação de Pearson.

Todos os testes foram realizados considerando-se um α (alfa) de 5%.

Os dados foram digitados em programa Excel (Microsoft Office 2007). A análise estatística foi realizada pelo software STATISTICA 9.1 e SPSS 11.0.

5 RESULTA DOS

Dados clínicos e amostras de placa bacteriana subgengival foram coletados de um total de 176 indivíduos, sendo 67 indivíduos com diagnóstico de Gengivite associada apenas à placa bacteriana (grupo G), 71 indivíduos com diagnóstico de Periodontite Crônica (grupo PC) e 38 indivíduos com diagnóstico de Periodontite Agressiva (grupo PA).

As descrições das características demográficas, idade e sexo, e das características clínicas (médias: número de dentes presentes, MG-JEC, PCS, NCI, SS) dos três grupos avaliados encontram-se na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Descrição dos dados clínicos

Variáveis (média $\pm$ DP)	G (n = 67)	PC (n=71)	PA (n=38)	P
Idade	28,45 ^A $\pm$ 6,34	43,06 ^{A,B} $\pm$ 12,32	28,50 ^B $\pm$ 5,50	< 0,01*
Nº mulheres(%)	31 (46,3%)	36 (50,7%)	27 (71,1%)	0,042**
Nº dentes	28,36 ^A $\pm$ 1,62	25,42 ^{A,B} $\pm$ 4,91	27,68 ^B $\pm$ 2,99	< 0,01*
MG-JEC(mm)	-0,01 ^{A,B} $\pm$ 0,06	0,46 ^A $\pm$ 0,58	0,54 ^B $\pm$ 0,68	< 0,01*
PCS(mm)	2,24 ^{A,B} $\pm$ 0,29	3,27 ^{A,C} $\pm$ 0,92	3,91 ^{C,B} $\pm$ 1,05	< 0,01*
NCI(mm)	2,24 ^{A,B} $\pm$ 0,28	3,73 ^{A,C} $\pm$ 1,27	4,48 ^{C,B} $\pm$ 1,54	< 0,01*
SS(%)	47,17 ^{A,B} $\pm$ 15,12	60,80 ^A $\pm$ 24,06	67,85 ^B $\pm$ 24,11	< 0,01*

DP = desvio padrão; G = Gengivite; PC = Periodontite Crônica; PA = Periodontite Agressiva

* diferença significativa ao nível $\alpha = 5\%$, teste ANOVA

** associação significativa ao nível $\alpha = 5\%$, teste qui-quadrado

Letras iguais na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos de acordo com o teste de Bonferroni

A análise estatística demonstrou a presença de uma associação significativa entre as variáveis grupo e porcentagem de mulheres, havendo uma maior proporção de mulheres no grupo PA.

A variável idade apresentou diferenças significativas entre os grupos PC e G e entre os grupos PC e PA, havendo semelhanças entre os valores médios de idade dos grupos G e PA ($28,45 \pm 6,34$ e $28,50 \pm 5,50$, respectivamente).

As medidas clínicas PCS e NCI foram diferentes significativamente entre os três grupos, havendo maiores valores no grupo PA e menores valores no grupo G. Esse resultado demonstra uma diferença significativa entre os indivíduos incluídos em cada grupo quanto a esses parâmetros clínicos periodontais.

As amostras de placa bacteriana subgengival de cada indivíduo foram agrupadas em um único tubo de microcentrifuga e, posteriormente, analisadas pela PCR em tempo real. Dessa maneira, os resultados microbiológicos obtidos correspondem a uma análise representativa do conjunto de sítios coletados de cada indivíduo e não a uma análise individual de cada sítio coletado.

Os valores médios das medidas clínicas MG-JEC, PCS e NCI, dos sítios selecionados para as coletas microbiológicas de cada grupo, encontram-se na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Parâmetros clínicos dos sítios das coletas microbiológicas

Variáveis (média $\pm$ DP)	G (n = 67)	PC (n=71)	PA (n=38)	P
MG-JEC(mm)	$-0,10^{A,B} \pm 0,27$	$0,46^{A,C} \pm 0,84$	$0,82^{C,B} \pm 0,87$	$<0,01^*$
PCS(mm)	$3,034^{A,B} \pm 0,30$	$6,55^{A,C} \pm 1,70$	$8,14^{C,B} \pm 1,32$	$<0,01^*$
NCI(mm)	$2,94^{A,B} \pm 0,19$	$7,01^{A,C} \pm 2,14$	$9,02^{C,B} \pm 1,74$	$<0,01^*$

DP = desvio padrão; G = Gengivite; PC = Periodontite Crônica; PA = Periodontite Agressiva

* diferença significativa ao nível $\alpha = 5\%$, teste ANOVA

Letras iguais na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos de acordo com o teste de Bonferroni

A análise estatística demonstrou valores médios das variáveis clínicas significativamente diferentes entre os três grupos, havendo maiores valores no grupo PA e menores no grupo G. Esse resultado demonstra que os sítios selecionados para as coletas microbiológicas foram significativamente diferentes entre os grupos G, PC e PA, para as variáveis clínicas analisadas.

As 176 amostras de placa bacteriana subgengival foram processadas juntamente com os controles de quantificação de cada espécie bacteriana, em triplicatas, a fim de se garantir a qualidade dos resultados. Médias dos valores de

quantificação foram calculadas, para cada uma das amostras clínicas, pelo próprio equipamento (ABI PRISM 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA).

O método de detecção pela PCR em tempo real revelou uma ampla quantificação, variando de $10^2/10^3$ a 10^9 células bacterianas.

Foram considerados como resultados positivos de detecção (presença), para cada patógeno analisado, todos os resultados de amplificação que apresentaram um valor de CT ≥ 38 , independentemente do limite mínimo de quantificação estabelecido para cada bactéria.

As porcentagens de indivíduos positivos para cada uma das bactérias, em cada grupo, estão descritas na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Porcentagem de indivíduos positivos para as bactérias analisadas nos grupos G, PC e PA

Bactéria	G (n = 67)	PC (n=71)	PA (n=38)	p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	67 (100%)	67 (94,4%)	35 (92,1%)	0,09
<i>P. gingivalis</i>	16 (23,9%)	54 (76,1)%	33 (86,8%)	<0,01*
<i>T. forsythia</i>	53 (79,1)%	68 (95,8%)	36 (94,7%)	<0,01*
<i>T. denticola</i>	40 (59,7%)	69 (97,2%)	38 (100%)	<0,01*
<i>D. pneumosintes</i>	54 (80,6%)	69 (97,2%)	37 (97,4%)	<0,01*

G = Gengivite; PC = Periodontite Crônica; PA = Periodontite Agressiva

* associação significativa ao nível $\alpha = 5\%$, teste qui-quadrado

Os cinco patógenos foram detectados nos três grupos analisados, apresentando porcentagens elevadas (>50%) de indivíduos positivos, com exceção de *P. gingivalis* no grupo G (23,9%).

Associação significativa entre grupo e presença da bactéria foi encontrada para *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *D. pneumosintes* ($p < 0,01$).

Para *A. actinomycetemcomitans* não houve associação significativa entre grupo e presença da bactéria ($p = 0,09$), apresentando porcentagens elevadas e semelhantes de detecção nos grupos G (100%), PC (94,4%) e PA (92,1%).

Na comparação entre os grupos PC e PA, semelhantes porcentagens de todos os cinco patógenos puderam ser observadas, enquanto que, na comparação

entre os grupos G e PC, maiores porcentagens de indivíduos positivos para as bactérias do complexo vermelho (*T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*) e *D. pneumosintes* foram detectadas no grupo PC.

Os valores de detecção dos grupos PC e PA foram unidos em um mesmo grupo (grupo P - periodontite), e novamente foi analisada a associação entre grupo e presença das bactérias (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Porcentagem de indivíduos positivos para as bactérias analisadas nos grupos G e P

Bactéria	G	P	p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	67 (100%)	102 (93,6%)	0,034*
<i>P. gingivalis</i>	16 (23,9%)	87 (79,8%)	<0,01*
<i>T. forsythia</i>	53 (79,1)%	104 (95,4%)	<0,01*
<i>T. denticola</i>	40 (59,7%)	107 (98,2%)	<0,01*
<i>D. pneumosintes</i>	54 (80,6%)	106 (97,2%)	<0,01*

G = Gengivite; P = Periodontite (Periodontite Crônica e Periodontite Agressiva)

* associação significativa ao nível $\alpha = 5\%$, teste qui-quadrado

O grupo P apresentou uma detecção significativamente maior ($p < 0,01$) de indivíduos positivos para *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *D. pneumosintes* em comparação com o grupo G. Em contraste, para o grupo G uma presença significativamente maior da bactéria *A. actinomycetemcomitans* foi detectada (100%) em relação ao grupo P (93,6%) ($p = 0,034$).

Os resultados quantitativos corresponderam somente às amostras clínicas que amplificaram dentro dos limites de quantificação estabelecidos pelas curvas padrão de cada bactéria. Os limites mínimos de quantificação para *A. actinomycetemcomitans* e para *T. denticola* foram de 1000 células, já para *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *D. pneumosintes*, foram de 100 células.

Os totais de amostras clínicas que amplificaram e os totais e porcentagens de amostras que foram quantificadas para cada patógeno, em todos os grupos clínicos, estão descritos na tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Descrição do número de amostras clínicas quantificadas

Bactéria	Limite mínimo de quantificação	G	PC	PA
<i>Aa</i>	10 ³ células	67 [†] / 64(95,5%)	67 [†] / 50(74,6%)	35 [†] / 26(74,3%)
<i>Pg</i>	10 ² células	16 [†] / 7(43,7%)	54 [†] / 50(92,6%)	33 [†] / 29(87,9%)
<i>Tf</i>	10 ² células	53 [†] / 46(86,8%)	68 [†] / 68(100%)	36 [†] / 36(100%)
<i>Td</i>	10 ³ células	40 [†] / 40(100%)	69 [†] / 67(97,1%)	38 [†] / 38(100%)
<i>Dp</i>	10 ² células	54 [†] / 31(57,4%)	69 [†] / 43(62,3%)	37 [†] / 26(70,3%)

G = Gengivite; PC = Periodontite Crônica; PA = Periodontite Agressiva

Aa = *A. actinomycetemcomitans*; *Pg* = *P. gingivalis*; *Tf* = *T. forsythia*, *Td* = *T. denticola*; *Dp* = *D. pneumosintes*

† total de amostras amplificadas

As médias dos valores quantitativos (número de cópias do genoma bacteriano ou número de células bacterianas) de cada bactéria, em cada grupo, estão descritas na tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Médias dos valores quantitativos das bactérias analisadas

Bactéria (média ± DP)	G	PC	PA	p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	8,28x10 ⁴ A ±1,76x10 ⁵	2,25x10 ⁴ B ±3,11x10 ⁴	1,66x10 ⁶ AB ±5,39x10 ⁶	<0,01*
<i>P. gingivalis</i>	2,6x10 ⁴ ±4,40x10 ⁴	1,2x10 ⁵ ±3,25x10 ⁵	2,2x10 ⁵ ±4,41x10 ⁵	0,35
<i>T. forsythia</i>	3,86x10 ⁵ A ±1,96x10 ⁶	3,59x10 ⁵ B ±1,40x10 ⁶	1,96x10 ⁶ AB ±4,82x10 ⁶	0,012*
<i>T. denticola</i>	1,02x10 ⁶ ±4,18x10 ⁶	5,4x10 ⁵ ±1,30x10 ⁶	1,56x10 ⁶ ±4,53x10 ⁶	0,31
<i>D. pneumosintes</i>	3,26x10 ³ ±6,84x10 ³	2,40x10 ³ ±5,69x10 ³	1,93x10 ³ ±2,85x10 ³	0,65

DP = desvio padrão; G = Gengivite; PC = Periodontite Crônica; PA = Periodontite Agressiva

* diferença significativa ao nível $\alpha = 5\%$, teste ANOVA

Letras iguais na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos de acordo com o teste de Bonferroni

Somente as bactérias *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,01$) e *T. forsythia* ($p = 0,012$) apresentaram quantidades subgengivais estatisticamente maiores no grupo PA ($1,66 \times 10^6 \pm 5,39 \times 10^6$ e $1,96 \times 10^6 \pm 4,82 \times 10^6$, respectivamente) em relação

ao grupo PC ($2,25 \times 10^4 \pm 3,11 \times 10^4$ e $3,59 \times 10^5 \pm 1,40 \times 10^6$, respectivamente) e ao grupo G ($8,28 \times 10^4 \pm 1,76 \times 10^5$ e $3,86 \times 10^5 \pm 1,96 \times 10^6$, respectivamente).

As cargas bacterianas subgingivais de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *D. pneumosintes* não apresentaram diferenças significativas entre os grupos G, PC e PA.

A correlação entre os parâmetros clínicos, PCS e NCI, com os valores de quantificação de cada patógeno estão descritos na tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Correlação entre parâmetros clínicos e quantidades de células bacterianas subgingivais

Parâmetro Clínico		<i>Aa</i>	<i>Pg</i>	<i>Tf</i>	<i>Td</i>	<i>Dp</i>
PCS (mm)	r	0,20	0,19	0,16	0,12	-0,10
	p	0,02*	0,09	0,05	0,17	0,30
NCI (mm)	r	0,19	0,26	0,16	0,11	-0,08
	p	0,02*	0,01*	0,05	0,18	0,40

Aa = *A. actinomycetemcomitans*; *Pg* = *P. gingivalis*; *Tf* = *T. forsythia*, *Td* = *T. denticola*; *Dp* = *D. pneumosintes*

Coeficiente de correlação de Pearson: $r < 0,2$, correlação muito fraca; $r < 0,5$, correlação fraca, $r < 0,7$, correlação moderada; $r < 0,9$, correlação forte; $r > 0,9$, correlação muito forte

* correlação significativa ao nível $\alpha = 5\%$

Em relação à variável PCS, houve uma correlação fraca com a carga bacteriana subgingival de *A. actinomycetemcomitans*. Para a variável NCI, houve uma correlação muito fraca com a quantidade de células subgingivais de *A. actinomycetemcomitans* e fraca com a de *P. gingivalis*.

6 DISCUSSÃO

A presença de periodontopatógenos na placa bacteriana de indivíduos saudáveis ou com Gengivite já foi demonstrada na literatura, geralmente em menor prevalência do que em indivíduos com destruição periodontal (Slots et al., 1980; Savitt et al., 1988; Simonson et al., 1988; Christersson et al., 1989; Müller et al., 1993; Wolff et al., 1993; Grossi et al., 1994; Ashimoto et al., 1996; Griffen et al., 1998; Haffajee et al., 1998; Faveri et al., 2009).

Alguns autores sugerem que a presença de patógenos periodontais em indivíduos sem destruição tecidual indica a possibilidade de que esses microrganismos possam não ser verdadeiros patógenos, ou que cepas com diferentes graus de virulência possam existir dentro de uma mesma espécie considerada patogênica (Socransky et al., 1991; Haffajee et al., 1992; Haffajee; Socransky, 1994).

Outra possível razão para a detecção destes patógenos no ambiente subgengival, sem estarem associados com a destruição periodontal, é a hipótese de que microrganismos são essenciais para a etiologia das doenças periodontais, mas não suficientes para iniciar a destruição do periodonto. Aparentemente um hospedeiro susceptível e quantidades subgengivais de periodontopatógenos, acima de certo limite crítico, são necessários para que a destruição irreversível dos tecidos periodontais ocorra (Mombelli et al., 1991; Haffajee et al., 1992; Haffajee; Socransky 1994; Page et al., 1997; van Winkelhoff et al., 2002; van Winkelhoff et al., 2003). Portanto, parece que não somente a detecção, mas também informações sobre a quantidade de células de cada espécie bacteriana presente no biofilme subgengival são necessárias para a compreensão da etiologia das doenças periodontais.

Baseados nessa teoria, estudos microbiológicos foram desenvolvidos com o objetivo de investigar as diferenças entre as cargas bacterianas subgengivais presentes nas diferentes condições periodontais, buscando um melhor entendimento do papel dos microrganismos no estabelecimento e na progressão destas doenças.

Entre as técnicas microbiológicas capazes de quantificar as cargas bacterianas subgengivais, a PCR em tempo real ou PCR quantitativa mostrou ser o método mais específico e sensível disponível (Heid et al., 1996; Conrads, 2002; Loomer, 2004; Mackay, 2004; Sanz et al., 2004; Sakamoto et al., 2005; Kubista et al., 2006). Em nosso estudo, optamos pela utilização do sistema TaqMan® da PCR

em tempo real por ser considerado um método mais específico e sensível para quantificação absoluta do que o sistema SYBR®-Green (Houghton; Cockerill, 2006).

A confiabilidade dos métodos da PCR em tempo real está intimamente associada à qualidade dos controles de quantificação. Não importa qual o controle é escolhido, é imperativo determinar com precisão sua concentração para permitir um cálculo correto da quantidade de DNA presente nas amostras clínicas (Mackay, 2004). Ao analisarmos os estudos de periodontia que utilizaram a tecnologia TaqMan®, observamos basicamente duas diferentes metodologias para a obtenção dos controles de quantificação. Há um grupo de estudos que utilizou a cultura das cepas alvo e observações ao microscópio, como forma de obtenção dos controles para a construção das curvas de quantificação. Esses estudos normalmente expressam seus valores como quantidades de unidades formadoras de colônia/ μ l, ou utilizam câmaras de contagem de células e expressam seus valores como quantidades de células bacterianas/ μ l (Asai et al., 2002; Boutaga et al., 2003, 2005, 2006; Kawada et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Yoshida et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Mineoka et al., 2008).

Outros estudos mais recentes, como os de Nonnenmacher et al. (2004), Nonnenmacher et al. (2005) e Gomes et al. (2006), aplicaram a técnica de clonagem para a obtenção de concentrações conhecidas de plasmídeos recombinantes, para cada bactéria alvo. Diluições seriadas dessas concentrações foram utilizadas como controles de quantificação e, dessa forma, obtiveram resultados expressos em quantidades de células bacterianas ou de cópias do genoma bacteriano/ μ l. Também utilizamos em nosso estudo essa técnica de clonagem do genoma bacteriano, por considerarmos essa forma de obtenção dos controles de quantificação da PCR em tempo real mais precisa e confiável.

Os resultados fornecidos pelos estudos envolvendo a aplicação da PCR em tempo real, também demonstraram a detecção de periodontopatógenos em indivíduos periodontalmente saudáveis e doentes, sendo que a carga bacteriana detectada na saúde foi inferior daquela detectada na doença (Lyons et al., 2000; Asai et al., 2002; Nonnenmacher et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2005; Boutaga et al., 2006; Braga et al., 2010). É importante salientar que, nenhum desses estudos analisou indivíduos com diagnóstico de Gengivite. Por isso, em nosso estudo, incluímos um grupo de indivíduos com Gengivite com o objetivo de analisarmos as quantidades de patógenos subgengivais presentes nesse tipo de condição

periodontal onde, apesar da presença de um processo inflamatório nos tecidos gengivais, não há perda de inserção, nem destruição do tecido ósseo alveolar.

A maioria dos resultados de estudos microbiológicos, que avaliaram amostras de placa bacteriana de indivíduos adultos com diagnóstico de Gengivite, através de cultura, testes imunológicos e enzimáticos, sondas de DNA e da PCR “convencional”, demonstrou a presença de patógenos como *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *D. pneumosintes*, porém em baixas frequências de detecção (Savitt et al., 1988; Christersson et al., 1989; Müller et al., 1993; Ashimoto et al., 1996; Tanner et al., 1998; Contreras et al., 2000; Lee et al., 2005; Jardim Júnior et al., 2006).

Nosso estudo também detectou a presença subgengival de *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *D. pneumosintes*, nos indivíduos diagnosticados com Gengivite, porém em porcentagens superiores às descritas na literatura. Em nossa pesquisa, com exceção de *P. gingivalis*, todas as outras bactérias avaliadas foram detectadas em mais de 50% dos indivíduos com Gengivite. Nossos maiores valores de detecção desses patógenos podem ser atribuídos à maior sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real, em comparação as outras técnicas de detecção (Heid et al., 1996; Lyons et al., 2000; Sakamoto et al., 2001; Maeda et al., 2003; Loomer, 2004; Nonnenmacher et al., 2004; Sanz et al., 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Nonnenmacher et al., 2005; Sakamoto et al., 2005; Boutaga et al., 2006; Kubista et al., 2006).

A avaliação da presença dos cinco patógenos nos três grupos, em nosso estudo, demonstrou uma associação significativa entre grupo e presença da bactéria para *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *D. pneumosintes*.

A. actinomycetemcomitans foi o único patógeno que não demonstrou associação significativa entre grupo e presença da bactéria ($p=0,09$), apresentando altas frequências de detecção nos grupos G (100%), PC (94,4%) e PA (92,1%). No entanto, quando comparamos os resultados de detecção entre os grupos G e P (PC e PA), obtivemos uma associação significativa entre grupo e presença da bactéria *A. actinomycetemcomitans* ($p=0,034$), havendo uma menor porcentagem de indivíduos positivos no grupo P (93,6%) do que no grupo G (100%).

Um achado importante foi a detecção de *A. actinomycetemcomitans* em 100% dos indivíduos com Gengivite. Outros estudos brasileiros também já indicaram um grau elevado de associação deste periodontopatógeno com a microbiota

subgengival da Periodontite Crônica e da Periodontite Agressiva (Tinoco et al. 1997; Ávila–Campos; Velásquez-Meléndez, 2002; Cortelli et al., 2005; Jardim Júnior et al., 2006; Rosalem Junior et al., 2006; Faveri et al., 2008), porém nenhum estudo apresentou um valor de detecção tão alto para *A. actinomycetemcomitans* na Gengivite quanto o nosso.

Sendo assim, poderíamos sugerir que, baseados somente nos resultados de detecção, a presença da bactéria *A. actinomycetemcomitans* no biofilme subgengival parece não ser diferente entre indivíduos com ou sem perda de inserção periodontal, pois, além da presença deste patógeno não apresentar associação significativa com nenhuma das três condições periodontais analisadas, apresentou frequências de detecção mais elevadas no grupo Gengivite.

Porém, ao analisarmos nossos resultados de quantificação, o microrganismo *A. actinomycetemcomitans* não esteve igualmente distribuído entre os grupos analisados, apresentando quantidades significativamente maiores na Periodontite Agressiva em relação à Periodontite Crônica e à Gengivite. Nossos valores de quantificação para *A. actinomycetemcomitans* nos grupos G e PC ficaram na ordem de 10.000 células, enquanto que no grupo PA ficaram em torno de 1.000.000 de células bacterianas.

Além de *A. actinomycetemcomitans*, a bactéria *T. forsythia* também apresentou uma carga subgengival significativamente maior no grupo PA, em comparação com os grupos PC e G.

Esses achados sugerem que maiores quantidades subgengivais das bactérias *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia*, em indivíduos adultos jovens (idade média de $28,50 \pm 5,50$ anos), estão associadas à Periodontite Agressiva.

A possibilidade da presença de cepas de *A. actinomycetemcomitans* com maior grau de virulência, nos indivíduos com Periodontite Agressiva, é uma hipótese que não pode ser descartada. Estudos já demonstraram que indivíduos com Periodontite Agressiva apresentaram uma maior prevalência de *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade do que indivíduos com Periodontite Crônica (Zambon, 1996; Haraszthy et al., 2000). Em nosso estudo não avaliamos o tipo de cepa de *A. actinomycetemcomitans* presente nos indivíduos avaliados, no entanto resultados observados na população brasileira confirmam a forte associação existente entre cepas de *A. actinomycetemcomitans* de máxima

leucotoxicidade com a Periodontite Agressiva (Cortelli et al., 2003; Cortelli et al., 2005).

Não existem outros trabalhos, além deste, que quantifiquem a carga subgengival de *T. forsythia*, através da PCR em tempo real, em indivíduos com Periodontite Agressiva. No entanto, diversos estudos que utilizaram outros métodos de detecção já demonstraram a associação deste patógeno com a Periodontite Agressiva (Tonetti; Mombelli, 1999; Darby et al., 2000; Mullally et al., 2000; Trevilatto et al., 2002; Kamma et al., 2004; Faveri et al., 2009). Faveri et al. (2009) detectaram altas proporções subgengivais principalmente de *T. forsythia* e de *P. gingivalis*, em amostras de placa de indivíduos brasileiros com Periodontite Agressiva Localizada, através do uso de sondas de DNA (*checkerboard DNA-DNA hybridization*).

Na comparação entre os grupos G e PC, as bactérias correspondentes ao complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*) apresentaram frequências de detecção maiores na Periodontite Crônica. A forte associação das três espécies bacterianas do complexo vermelho com a Periodontite Crônica já foi demonstrada por diversos estudos (Ashimoto et al., 1996; Socransky et al., 1998; Holt; Ebersole, 2005; Ximenez-Fyvie et al., 2006; Mineoka et al., 2008). Estudos brasileiros que avaliaram a microbiota associada à Periodontite Crônica também demonstraram altas frequências de detecção dos microrganismos do complexo vermelho (Ávila-Campos; Velásquez-Meléndez, 2002; Colombo et al., 2002).

Nossos resultados de detecção para este grupo de patógenos, na Periodontite Crônica, também estão de acordo com os apresentados por outros estudos que utilizaram a tecnologia TaqMan® da PCR em tempo real (Asai et al., 2002; Nonnenmacher et al., 2004; Yoshida et al., 2004; Boutaga et al., 2005; Nonnenmacher et al., 2005).

Há dois estudos brasileiros que avaliaram a microbiota presente na Periodontite Crônica através da PCR em tempo real, porém, utilizando a tecnologia SYBR®-Green (Del Peloso Ribeiro et al., 2008; Braga et al., 2010). Os resultados qualitativos apresentados por Braga et al. (2010) revelaram presenças semelhantes às detectadas em nosso estudo (100% para *A. actinomycetemcomitans* e 70% para *P. gingivalis*).

Apesar das bactérias do complexo vermelho apresentarem uma detecção maior na Periodontite Crônica, nossa análise dos valores de quantificação não demonstrou diferenças significativas entre as cargas bacterianas subgengivais dos

cinco patógenos analisados entre os grupos G e PC. A semelhança das cargas bacterianas entre estes grupos confirma a hipótese de que a interferência de outros fatores, além da simples presença dos microrganismos, é necessária para que a perda de inserção seja iniciada. A ocorrência simultânea de outras condições, como um hospedeiro susceptível e um ambiente subgengival propício para a colonização e a expressão de fatores de virulência pelos patógenos, são essenciais para o início e a progressão da doença periodontal (Haffajee e Socransky 1994; Page et al., 1997; van Winkelhoff, 2003). Dessa maneira, estabelecidas essas condições favoráveis, diferentes combinações de microrganismos, assim como algumas espécies específicas, podem produzir o potencial patogênico necessário para causar a progressão da Gengivite para a periodontite (Slots; Genco, 1984; Theilade, 1986; van Winkelhoff; de Graaff, 1991; Socransky et al., 1998).

Em nosso estudo, uma semelhança entre as freqüências de detecção dos cinco patógenos avaliados foi obtida entre os grupos Periodontite Crônica e Periodontite Agressiva. Outro estudo, que utilizou a tecnologia TaqMan® da PCR em tempo real, também demonstrou semelhantes porcentagens de indivíduos positivos para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *D. pneumosintes* entre os grupos Periodontite Agressiva e Periodontite Crônica (Nonnenmacher et al., 2005). Ximenez-Fyvie et al. (2006), apesar de utilizarem outra técnica de biologia molecular (*checkerboard DNA-DNA hybridization*), também demonstraram ausência de diferenças significativas entre as prevalências de periodontopatógenos na Periodontite Crônica e na Periodontite Agressiva. Essa semelhança também foi confirmada por uma revisão de literatura apresentada por Mombelli et al. (2002).

No entanto, quando os valores de quantificação foram calculados para os indivíduos com Periodontite Crônica e Periodontite Agressiva, pudemos observar menores cargas bacterianas de todos os microrganismos, com exceção de *D. pneumosintes*, no grupo PC, sendo que diferenças significativas foram detectadas somente para as quantidades de *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia*.

Maiores freqüências de detecção de *D. pneumosintes* nos grupos PC e PA foram obtidas em nosso estudo, em relação ao grupo G. Outros estudos utilizando técnicas moleculares também relataram maiores freqüências de detecção de *D. pneumosintes* em sítios com destruição periodontal (Contreras et al., 2000; Doan et al., 2000; Ghayoumi et al., 2002; Nonnenmacher et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2005; Gomes et al., 2006, Ferraro et al., 2007). Porém, somente Nonnenmacher et

al. (2004), Nonnenmacher et al. (2005) e Gomes et al. (2006) apresentam dados referentes à carga subgengival de *D. pneumosintes*. Nonnenmacher et al. (2004) demonstraram maiores quantidades dessa bactéria em indivíduos com doença periodontal do que em indivíduos saudáveis, e Nonnenmacher et al. (2005) apresentaram maiores quantidades na Periodontite Agressiva do que na Periodontite Crônica.

Nossa análise quantitativa demonstrou que a carga bacteriana subgengival de *D. pneumosintes* foi muito semelhante entre os grupos analisados. Além disso, *D. pneumosintes* foi a bactéria que apresentou os menores valores quantitativos em todos os grupos. Esse resultado sugere que *D. pneumosintes* não pôde ser associada a nenhuma das condições periodontais analisadas por nosso estudo. Não há nenhum estudo envolvendo indivíduos brasileiros que tenha quantificado os níveis subgengivais de *D. pneumosintes* na saúde, na Gengivite ou na Periodontite Agressiva. Os dados presentes na literatura, que sugerem que essa bactéria possa estar relacionada com a etiologia e a progressão da doença periodontal, são resultantes de estudos de associação. De acordo com Socransky (1979) outros critérios, além de associação, precisam ser preenchidos para que uma espécie possa ser definida como um verdadeiro periodontopatógeno.

A comparação dos nossos resultados de quantificação com outros apresentados na literatura é limitada, pois a quantidade de estudos envolvendo a aplicação do sistema TaqMan® da PCR em tempo real para a quantificação absoluta das cargas bacterianas subgengivais, em indivíduos com doença periodontal, ainda é muito reduzida. Se levarmos em consideração as diferenças quanto às metodologias aplicadas para a obtenção dos controles de quantificação, nossas dificuldades aumentam ainda mais, pois somente três estudos utilizaram procedimentos de clonagem para esse propósito (Nonnenmacher et al., 2004; Nonnenmacher et al., 2005; Gomes et al., 2006). Além disso, somente um estudo, além do nosso, quantificou patógenos em amostras de placa bacteriana de indivíduos com Periodontite Agressiva (Nonnenmacher et al., 2005).

A relação entre as quantidades de microrganismos presentes no biofilme subgengival e os parâmetros clínicos, também pode ser um importante fator determinante para o desenvolvimento das doenças periodontais.

Em nosso estudo, valores baixos do coeficiente de correlação de Pearson foram obtidos na correlação entre as variáveis clínicas (PCS e NCI) e a quantidade

de células bacterianas subgengivais. Sendo assim, somente correlações fracas ou muito fracas foram observadas entre a carga subgengival de *A. actinomycetemcomitans* e as variáveis PCS e NCI, respectivamente. O parâmetro clínico NCI também foi fracamente correlacionado com a carga subgengival de *P. gingivalis*. Embora o estudo de Nonnenmacher et al. (2005) tenha relatado uma correlação positiva entre PCS e a carga bacteriana de *P. gingivalis*, o valor do coeficiente de correlação de Spearman Rank obtido também representou uma correlação fraca entre essas duas variáveis.

A comparação entre os dados de detecção e de quantificação apresentados por nosso estudo sugerem que a análise quantitativa demonstrou ser uma ferramenta necessária para complementar as informações fornecidas pela análise qualitativa. No entanto, pesquisas longitudinais são necessárias para esclarecer a relação entre as quantidades subgengivais de bactérias periodontopatogênicas e a etiologia da perda de inserção periodontal.

7. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada nesse estudo, podemos concluir que:

- Não houve associação significativa entre grupo e a presença da bactéria *A. actinomycetemcomitans*. Houve associação significativa entre grupo e presença da bactéria para *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *D. pneumosintes*.

- As quantidades subgengivais de *A. actinomycetemcomitans* e de *T. forsythia* foram significativamente maiores no grupo Periodontite Agressiva, em relação aos grupos Gengivite e Periodontite Crônica, não havendo diferenças entre os grupos para as cargas subgengivais das demais bactérias.

- Os grupos Gengivite e Periodontite Crônica não apresentaram diferenças significativas quanto aos valores de quantificação dos cinco patógenos analisados.

- A correlação obtida entre as cargas bacterianas subgengivais e os parâmetros clínicos, PCS e NCI, foi fraca ou muito fraca.

REFERÊNCIAS⁺

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5721-32.

Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Takahashi N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. *J Periodontal Res*. 2010 Jun;45(3):389-95. Epub 2010 Mar 9.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403–410.

American Academy of Periodontology. Consensus report on periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*. 1996;1:926–32.

American Academy of Periodontology. International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4:1-112

Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010 Jun;53:70-88.

Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol 2000*. 2004;34:22-33.

Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3334-40.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontal lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1996;11(4):266-73.

Avila-Campos MJ, Velásquez-Meléndez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002 Jan-Feb;44(1):1-5.

⁺ De acordo com o Estilo Vancouver.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol*. 2003;41(11):4950-4.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 1;45(2):191-9.

Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*. 2006;33(6):427-33.

Braga RR, Carvalho MA, Bruña-Romero O, Teixeira RE, Costa JE, Mendes EN, Farias LM, Magalhães PP. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *Anaerobe*. 2010 Jun;16(3):234-9. Epub 2010 Mar 1.

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 Dec;24(6):469-77.

Chen C, Slots J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 1999 Jun;20:53-64.

Christersson LA, Fransson CL, Dunford RG, Zambon JJ. Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. *J Periodontol*. 1992;63(5):418-25.

Christersson LA, Zambon JJ, Dunford RG, Grossi SG, Genco RJ. Specific subgingival bacteria and diagnosis of gingivitis and periodontitis. *J Dent Res*. 1989 Nov;68(Spec Iss):1633-39

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém WJ, Mendes MC, Uzeda M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2002 Apr;73(4):360-9.

Conrads G. DNA probes and primers in dental practice. *Clin Infect Dis*. 2002 Sep 1;35(Suppl 1):S72-7.

Contreras A, Doan N, Chen C, Rusitanonta T, Flynn MJ, Slots J. Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(4):269-72.

Cooper, G.M. and Hausman, R.E. *The Cell: A Molecular Approach*. 3d ed. Sunderland, MA: 2003 Amer. Soc. Microbiol.

Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Aug;32(8):860-6.

Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy VI. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Apr-Jun;18(2):110-5.

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol*. 2000 Jun;27(6):417-24.

Del Peloso Ribeiro E, Bittencourt S, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(9):789-98.

Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*. 2001 Nov;31(5):1106-21.

Doan N, Contreras A, Flynn J, Slots J, Chen C. Molecular identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. *J Clin Microbiol*. 2000;38(8):3043-7.

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1988 May;15(5):316-23.

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

Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009 Sep;36(9):739-49.

Faveri M, Mayer MP, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Apr;23(2):112-8.

Ferraro CT, Gornic C, Barbosa AS, Peixoto RJ, Colombo AP. Detection of *Dialister pneumosintes* in the subgingival biofilm of subjects with periodontal disease. *Anaerobe*. 2007 Oct-Dec;13(5-6):244-8.

Gainet J, Dang PM, Chollet-Martin S, Brion M, Sixou M, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Neutrophil dysfunctions, IL-8, and soluble L-selectin plasma levels in rapidly progressive versus adult and localized juvenile periodontitis: variations according to disease severity and microbial flora. *J Immunol*. 1999 Nov 1;163(9):5013-9.

Genco RJ, Zambon JJ, Christersson LA. Use and interpretation of microbiological assays in periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 1986 Nov;1(1):73-81.

Ghayoumi N, Chen C, Slots J. *Dialister pneumosintes*, a new putative periodontal pathogen. *J Periodontal Res*. 2002;37(1):75-8.

Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, Marcantonio RA. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol*. 2006;77(9):1483-90.

Goodson JM, Tanner A, McArdle S, Dix K, Watanabe SM. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy. III. Microbiological response. *J Periodontal Res*. 1991 Sep;26(5):440-51.

Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol*. 1998;36(11):3239-42.

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

Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*. 1998 May;25(5):346-53.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:78-111.

Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. Relation of baseline microbial parameters to future periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol*. 1991;18(10):744-50.

Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *J Clin Periodontol*. 1992;19(2):84-91.

Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, Zambon JJ. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol*. 2000 Jun;71(6):912-22.

Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14(5):326-30.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):986-94.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992 Apr;10(4):413-7.

Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005;38:72-122.

Houghton SG, Cockerill FR 3rd. Real-time PCR: overview and applications. *Surgery*. 2006 Jan;139(1):1-5.

Hutter G, Schlagenhaut U, Valenza G, Horn M, Burgemeister S, Claus H, Vogel U. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phylotypes and putative pathogens. *Microbiology*. 2003 Jan;149(Pt 1):67-75.

Jardim Júnior EG, Bosco JM, Lopes AM, Landucci LF, Jardim EC, Carneiro SR. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects and children with gingivitis in two cities of the state of São Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2006 Jun;14(3):153-6.

Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2005;32(7):778-83.

Kamma JJ, Nakou M, Gmür R, Baehni PC. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Oct;19(5):314-21.

Kawada M, Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Saito T, Oho T, Koga T. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(5): 289–92.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125. Epub 2006 Feb 3.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003 May;82(5):338-44.

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(12):1061-9.

Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol.* 2005 Jun;43(3):260-5.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965;36:177-87.

Löe H, Theilade E, Jensen SB, Schiott CR. Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. J Periodontal Res. 1967;2(4):282-9.

Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev. 1976;9:65-91.

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

Lotufo RF, Flynn J, Chen C, Slots J. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1994;9(3):154-60.

Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. J Clin Microbiol. 2000;38(6):2362-5.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect. 2004 Mar;10(3):190-212.

Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 Oct 24;39(1):81-6.

Maiden MF, Carman RJ, Curtis MA, Gillett IR, Griffiths GS, Sterne JA, Wilton JM, Johnson NW. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: laboratory markers based on the microbiological analysis of subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1990 Jan;17(1):1-13.

Mandell RL, Ebersole JL, Socransky SS. Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. J Clin Periodontol. 1987 Oct;14(9):534-40.

Mandell RI, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. J Periodontol. 1981;52:593-8.

Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, Takehara T. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of

Porphyromonas gingivalis, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol*. 2008 Apr;79(4):670-6.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:10-21; discussion 37-8.

Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. *J Periodontal Res*. 1991 Jul;26(4):308-13.

Moore LV, Moore WE, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Best AM, Ranney RR. Bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res*. 1987 May;66(5):989-95.

Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun*. 1985 May;48(2):507-19.

Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun*. 1983 Nov;42(2):510-5.

Moore WEC, Holdeman LV, Smibert RM, Good IJ, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect Immun*. 1982a;38(2):651-67.

Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Hash DE, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun*. 1982b Dec;38(3):1137-48.

Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:66-77.

Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*. 2004 Dec;31(12):1054-60.

Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolff LF, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *J Periodontal Res*. 2000 Aug;35(4):232-41.

Müller HP, Lange DE, Müller RF. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* recovery from extracrevicular locations of the mouth. *Oral Microbiol Immunol*. 1993 Dec;8(6):344-8.

Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontal Res*. 1977;12(2):120-8.

Newman MG, Socransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A. Studies of the microbiology of periodontosis. *J Periodontol*. 1976;47(7):373-9.

Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 2004;59(1):117-25.

Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol*. 2005;76(9):1542-9.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:216-48.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001 Jun;183(12):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.

Rams TE, Listgarten MA, Slots J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. *J Clin Periodontol*. 1996 Apr;23(4):346-54.

Riep B, Edesi-Neuss L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF, Bernimoulin JP, Göbel UB, Moter A. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J Clin Microbiol*. 2009 Jun;47(6):1705-11. Epub 2009 Apr 22.

Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Goené RJ, Abbas F, de Graff J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol*. 1990 Jul;17(6):392-9.

Rosalem Junior W, Andrade AFB, Colombo APV. Prevalence of leukotoxic genotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Brazilians with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol*. 2006;37(4):590-6.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4.

Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 May;52(Pt 3):841-9.

Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol Immunol*. 2001;45(1):39-44.

Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodont Res*. 2005 Jun;40(3):277-85.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol*. 2004 Dec;31(12):1034-47.

Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK, Peros WJ, French CK. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. *J Periodontol*. 1988 Jul;59(7):431-8.

Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA. Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*. 2000 Jan;39(2):97-107.

Simonson LG, Goodman CH, Bial JJ, Morton HE. Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infect Immun*. 1988 Apr;56(4):726-8.

Skipper M, Johansen LB, Pedersen KB, Frederiksen S, Johansen BB. Cloning and transcription analysis of an AGAMOUS- and SEEDSTICK ortholog in the orchid *Dendrobium thyrsiflorum* (Reichb. f.). *Gene*. 2006 Feb 1;366(2):266-74.

Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol*. 1986;13(10):912-7.

Slots J. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand J Dent Res*. 1977a;85(4):247-54.

Slots, J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1979;6(5):351-82.

Slots, J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res*. 1977b;85(2):114-21.

Slots, J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res*. 1976;84(1):1-10.

Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis*. 1995 Jun;20 Suppl 2:S304-7.

Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res*. 1984 Mar;63(3):412-21

Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1988 Feb;15(2):85-93.

Slots J, Möenbo D, Langebaek J, Frandsen A. Microbiota of gingivitis in man. *Scand J Dent Res*. 1978;86(3):174-81.

Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun*. 1980;29(3):1013-20.

Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000. 1999 Jun;20:82-121.

Socransky SS. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1979;6(7):16-21.

Socransky SS. Microbiology of periodontal disease - present status and future considerations. *J Periodontol*. 1977;48(9):497-504.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000. 1994;5:7-25

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005;38:135-87.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992;63(4 Suppl):322-31.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol*. 1991;18(10):766-75.

Suzuki N, Yoshida A, Saito T, Kawada M, Nakano Y. Quantitative microbiological study of subgingival plaque by real-time PCR shows correlation between levels of *Tannerella forsythensis* and *Fusobacterium* spp. *J Clin Microbiol*. 2004 May;42(5):2255-7.

Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):85-98.

Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol.* 1979;6(5):278-307.

Tanner AC, Izard J. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontol 2000.* 2006;42:88-113.

Tanner AC, Socransky SS, Goodson JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J Periodontal Res.* 1984;19(3):279-91.

Tanner ACR, Listgarten MA, Ebersole JL, Strzempko MN. *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. *Int J Syst Bacteriol.* 1986;36:213-21.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2006;42:180–218

Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases *J Clin Periodontol.* 1986;13(10):905-11

Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res.* 1966;1:1-13.

Tinoco EM, Beldi MI, Loureiro CA, Lana M, Campedelli F, Tinoco NM, Gjermo P, Preus HR. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. *Eur J Oral Sci.* 1997 Feb;105(1):9-14.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999 Dec;4(1):39-53.

Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Gonçalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002 Mar;29(3):233-9.

van Winkelhoff AJ. Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *Int J Dent Hyg.* 2003 Aug;1(3):131-7.

van Winkelhoff AJ, de Graaff J. Microbiology in the management of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991;18(6):406-10

van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol. 2002;29(11):1023-8.

van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, de Graaff J. The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections. J Clin Periodontol. 1988 Mar;15(3):145-55.
Wolff LF, Aeppli DM, Pihlstrom B, Anderson L, Stoltenberg J, Osborn J, Hardie N, Shelburne C, Fischer G. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. J Clin Periodontol. 1993;20(10):699-706.

Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. J Periodontol. 2006 Mar;77(3):460-71.

Yoshida A, Kawada M, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Saito T, Yamashita Y. TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for the correlation of Treponema denticola numbers with the severity of periodontal disease. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(3):196-200.

Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Kawada M, Koga T. Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. J Clin Microbiol. 2003 Feb;41(2):863-6.

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol. 1985;12:1-20.

Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. Ann Periodontol. 1996;1(1):879-925.

Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J Periodontol. 1983;54(12):707-11.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido de participação em pesquisa

Como paciente voluntário da pesquisa “Detecção e quantificação de bactérias no biofilme subgengival de indivíduos com diferentes formas de doença periodontal”, recebi explicações sobre o estudo a ser realizado e tenho consciência que o objetivo da pesquisa é determinar se sou portador de cinco espécies bacterianas. Responderei a um questionário de saúde e passarei por exames clínico e radiográfico, com o objetivo de determinar meu estado de saúde bucal e a presença ou não de doença periodontal. Os procedimentos da pesquisa aos quais serei submetido compreendem uma coleta de placa bacteriana subgengival, realizada pela aluna Prática Profissionalizante – tipo investigação, da disciplina de Periodontia da FOU SP, “Daniele Salami”, anteriormente ao início do meu tratamento periodontal, em quatro dentes selecionados. Essas coletas não representam qualquer risco à minha saúde, não causam nenhum dano às estruturas examinadas e nem sintomatologia dolorosa. Durante o período em que participarei da pesquisa receberei assistência integral do pesquisador e, após o término dos procedimentos da pesquisa, receberei tratamento periodontal adequado e acompanhamento nas clínicas de Pós-Graduação ou de Graduação, da disciplina de Periodontia, da FOU SP. Minha identidade será preservada de forma que meu nome não constará em publicações subseqüentes à pesquisa, nem será citado em cursos, palestras ou aulas expositivas. Não receberei nenhum pagamento pela minha participação na pesquisa e também não pagarei pelo tratamento. Fica claro que eu terei o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, de forma a imperar o meu livre arbítrio.

Nome:

Data de nascimento: Telefone:

R.G: Data de expedição:

Endereço:

Declaro estar de pleno acordo com os termos acima e optar pela participação voluntária na pesquisa supracitada.

São Paulo,

Assinatura

ANEXO A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO Protocolo 01/04

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa ***"Dialister pneumosintes: detecção molecular e associação à doença periodontal"***, de responsabilidade da pesquisadora **Daniele Salami**, sob orientação do Professor Doutor **Roberto Fraga Moreira Lotufo**.

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, 28 de abril de 2004

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

ANEXO B - Ficha de anamnese da Disciplina de Periodontia da FOU SP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 Departamento de Estomatologia
 Disciplina de Periodontia

PACIENTE:.....R.G.....
 SEXO.....DATA DE NASCIMENTO...../...../.....ESTADO CIVIL.....
 NACIONALIDADE.....NATURALIDADE.....
 ENDEREÇO:Res.....CEP.....TEL:.....
 Com.....CEP.....TEL:.....
 PROFISSÃO:.....EXAMINADO POR:.....

DECLARAÇÃO

Eu,.....R.G.....
 declaro para todos os fins legais, que prestarei esclarecimentos corretos sobre o meu estado de
 saúde, nada omitindo no questionário que se segue:

São Paulo, de de

CUIDADOS ESPECIAIS:

.....

SAÚDE GERAL

1. Está em tratamento médico? sim () não ()
2. Foi submetido a alguma cirurgia? sim () não ()
3. Teve alguma destas doenças:
 - Hepatites sim () não ()
 - Tuberculose sim () não ()
 - Ataque Cardíaco sim () não ()
 - Diabetes sim () não ()
 - Febre Reumática sim () não ()
4. Toma anticoagulante (AAS)? sim () não ()
5. É fumante? Sim () não () Quantos?.....
6. Pressão alta? sim () não ()
7. Sofre dos rins ou bexiga? sim () não ()
8. Tem com frequência algum tipo de hemorragia sim () não ()
9. Aparecem manchas roxas no corpo com frequência sim () não ()
10. Anemia? sim () não ()
11. Tem alguma alergia? sim () não ()
12. Alergia a quê? sim () não ()
13. Já recebeu transfusão de sangue? sim () não ()
14. Tem doença sexualmente transmissível (AIDS) sim () não ()
15. Tem tonturas? sim () não ()
16. Tem convulsões? sim () não ()
17. Menstruação normal? sim () não ()
18. Está grávida? sim () não ()
19. Toma anticoncepcional? sim () não ()
20. Está na menopausa? sim () não ()
21. Medicamento em uso:

PARTE ODONTOLÓGICA

1. Queixa do Paciente:
2. Já teve feridas nos lábios ou língua que demoraram para sarar? sim () não ()
3. Come muito doce? sim () não () Refrigerantes: sim () não ()
4. Tem hábito de ranger ou apertar os dentes? sim () não ()
5. Tem sangramento gengival? sim () não ()
6. Tem dor nas gengivas? sim () não ()
7. Tem dentes abalados? sim () não ()
8. Quantas vezes por dia escova os dentes? sim () não ()
9. Usa escova: dura () média () mole () Pasta:
10. Utiliza fio ou fita dental? sim () não ()
11. Quantas vezes por dia?
12. Usa outros métodos de limpeza? sim () não ()
13. Quais?
14. Bochechos? Sim () não () Qual?.....
15. Já fez aplicação tópica de flúor? sim () não ()

ANEXO C - Ficha de periograma da Disciplina de Periodontia da FOUSP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – FACULDADE DE ODONTOLOGIA											
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA											
DISCIPLINAS DE PERIODONTIA											
PACIENTE: _____										Nº: _____	
IDADE: _____ SEXO: _____ RAÇA: _____										DATA DO EXAME: ____/____/____	
FICHA		INICIAL ()		REAValiaÇÃO ()		FINAL ()					
UEC – MG											
PCS – SS											
NCI
VESTIBULAR
PALATINA			
UEC – MG											
PCS – SS											
NCI
LINGUAL
VESTIBULAR			
UEC – MG											
PCS – SS											
NCI

Índice de Sangramento: ____%

PSR