

MARIANA ROCHA GUGLIELMETTI

**Detecção e quantificação de patógenos periodontais em fumantes e não
fumantes com periodontite crônica pela PCR em tempo real**

São Paulo

2013

MARIANA ROCHA GUGLIELMETTI

**Detecção e quantificação de patógenos periodontais em fumantes e não
fumantes com periodontite crônica pela PCR em tempo real**

Versão Original

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. Dr. Cláudio Mendes Pannuti

São Paulo

2013

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

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

Guglielmetti, Mariana Rocha.

Detecção e quantificação de patógenos periodontais em fumantes e não fumantes com periodontite crônica pela PCR em tempo real / Mariana Rocha Guglielmetti; orientador Cláudio Mendes Pannuti. -- São Paulo, 2013.

49 p.: il. : 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.

Versão original.

1. Periodontite crônica. 2. Fumo - Odontologia. 3. Microbiologia bucal. I. Pannuti, Cláudio Mendes. II. Título.

Guglielmetti MR. Detecção e quantificação de patógenos periodontais em fumantes e não fumantes com periodontite crônica pela PCR em tempo real. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho ao Fernando, meu marido e companheiro de todos os momentos. Obrigada por seu apoio, carinho, compreensão e paciência durante meu curso de Mestrado, e por estar sempre disponível a me ajudar em tudo que precisei.

Amo você!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço aos meus queridos pais, Aurélio e Monica, meus exemplos de vida! Obrigada por sempre estarem ao meu lado, me apoiarem incondicionalmente e por terem me dado todos os princípios de vida que carrego comigo. Vencemos juntos mais esta etapa!

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti, que me confiou este trabalho. Só tenho que agradecer o privilégio de ter sido sua orientada durante estes mais de 4 anos. Posso me considerar uma aluna de sorte! Sempre muito presente e prestativo. Muito obrigada por tudo que me ensinou, pela humildade e pelo exemplo de orientador e pessoa que é. Você realmente é um grande mestre!

Cissa, Gi e Elaine, nem sei como agradecê-las.... Muito obrigada por toda a dedicação de vocês para que este trabalho pudesse ser realizado. Mesmo após terminados os próprios projetos, vocês continuaram firmes no nosso grupo para me ajudar! Não tenho palavras para expressar o carinho que tenho por vocês. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos, pelas clínicas, pelas viagens, pelos congressos, pelas vitórias..., enfim, por todas as experiências que vivemos nestes anos todos como “grupo do fumo”! Esta conquista é nossa!

À Verô, por compartilharmos momentos de dificuldade e superação em nossas idas ao laboratório. Obrigada pela amizade que criamos e pelo delicioso convívio durante estes anos. Foi muito bom tê-la como companheira de bancada. Cada passo que superamos juntas no laboratório foi uma grande vitória.

À Dani Salami, muito obrigada pelos conhecimentos transmitidos, pela disposição em me ajudar e por me “apresentar” ao LABMAD. Graças aos seus ensinamentos pude conduzir este trabalho com muito mais tranquilidade.

Aos colegas de turma Mari, Marcelo, Henrique Bueno, Eduardo, Priscila e Michele, muito obrigada pelas risadas, pelos momentos de descontração (e tensão também!) que passamos juntos nas clínicas e seminários. Com vocês tudo ficou mais divertido! Levarei para sempre a amizade que construímos nestes 2 anos de curso.

Ao Prof. Titular Mário Hiroyuki Hirata, muito obrigada por nos receber em seu laboratório tão gentilmente para execução deste projeto. Obrigada por todo conhecimento transmitido, pela confiança em mim depositada e por me introduzir ao

vasto mundo da biologia molecular. Agradeço por toda a atenção, e por estar sempre disponível para conversar e tirar nossas dúvidas.

Às alunas de iniciação que trabalharam conosco ao longo destes anos Gabriela, Renata, Alessandra, Bárbara e Amanda: muito obrigada por toda a ajuda de vocês, meninas, na execução das partes clínicas e laboratoriais deste estudo.

Às Profas. Luciana Saraiva e Silvana Cai, pela valorosa contribuição no exame de qualificação.

Aos professores da disciplina de Periodontia da FOUSP Prof. Francisco Pustiglioni, Prof. Giorgio De Micheli, Prof. Giuseppe Romito, , Prof. João Batista, Profa. Luciana Saraiva, Prof. Luiz Lima, Prof. Marco Georgetti, Profa. Marina Conde e Profa. Marinella Holzhausen, meus agradecimentos pelos ensinamentos e pelo convívio durante o curso.

À Profa. Rosário Dominguez Crespo Hirata, pela colaboração neste trabalho.

Agradeço imensamente à técnica de laboratório Cristina Fajardo, por sempre estar disponível a me ajudar.

Às secretárias da disciplina de Periodontia Márcia e Marília, por toda a assistência sempre pronta a qualquer momento.

Aos pacientes que se voluntariaram a participar desta pesquisa; os verdadeiros protagonistas deste trabalho. Muito obrigada!

À Fapesp, pelo apoio financeiro que tornou viável a execução deste projeto (processo 2011/02975-3).

RESUMO

Guglielmetti MR. Detecção e quantificação de patógenos periodontais em fumantes e não fumantes com periodontite crônica pela PCR em tempo real. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

O objetivo do presente trabalho foi comparar fumantes e não fumantes com periodontite crônica com relação a presença e quantidade de patógenos periodontais, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real. Quarenta fumantes e quarenta não fumantes, pareados por idade, sexo e profundidade clínica de sondagem dos sítios de coleta microbiológica, foram incluídos no estudo. Foi realizado exame periodontal completo, e coletado um *pool* de biofilme subgingival dos sítios mais profundos de cada quadrante, em cada sujeito de pesquisa. Para confirmar os dados sobre tabagismo, os sujeitos foram submetidos à avaliação das concentrações de monóxido de carbono expirado, através de um monoxímetro. A presença e quantificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foi determinada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real. Fumantes apresentaram maior média de profundidade clínica de sondagem ($p = 0,001$) e nível clínico de inserção ($p = 0,006$), e menos sítios com sangramento à sondagem ($p = 0,001$) do que os não fumantes. Foi observada associação entre fumo e presença de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,001$). Contagens médias de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,001$), *P. gingivalis* ($p = 0,042$) e *T. forsythia* ($p < 0,001$) foram significativamente maiores nos fumantes. Os resultados permitiram concluir que o fumo altera a composição da microbiota subgingival em indivíduos com periodontite crônica, com diferenças na presença e quantidade dos patógenos periodontais investigados.

Palavras-chave: Periodontite crônica. Reação em cadeia da polimerase. Microbiologia. Fumo. Bactéria.

ABSTRACT

Guglielmetti MR. Detection and quantification of periodontal pathogens in smokers and never-smokers with chronic periodontitis by Real-Time Polymerase Chain Reaction [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

The aim of the present investigation is to compare smokers and nonsmokers with chronic periodontitis, regarding the presence and quantity of periodontal pathogens, using real-time polymerase chain reaction. Forty current smokers and forty never-smokers, matched for age, sex and sampling sites mean probing depth, were included in this investigation. A full-mouth periodontal examination was performed, and a pooled subgingival plaque sample was collected from the deepest site, in each quadrant, of each subject. To confirm smoking status, subjects had their expired air carbon monoxide concentrations measured with the help of a carbon monoxide monitor. The presence and quantification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* were determined by real-time polymerase chain reaction. Smokers presented greater overall mean probing depth ($p = 0,001$) and mean clinical attachment level ($p = 0,006$), and fewer bleeding on probing sites ($p = 0,001$). An association was observed between smoking status and presence of *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0.001$). Counts of *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,001$), *P. gingivalis* ($p = 0,042$) and *T. forsythia* ($p < 0,001$) were significantly higher in smokers. We concluded that smoking changes the composition of the subgingival microbiota in chronic periodontitis patients, with differences in the presence and quantification of investigated periodontopathogens.

Keywords: Chronic periodontitis. Polymerase chain reaction. Microbiology. Smoking. Bacteria.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Exemplo de curva padrão para a bactéria *A. actinomycetemcomitans*..... 29
- Figura 5.1 - Presença de *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*), *P. gingivalis* (*Pg*), *T. forsythia* (*Tf*) e *T. denticola* (*Td*), nos pacientes dos grupos F e NF34

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Sequências dos iniciadores e sondas	31
Tabela 5.1- Comparação entre F e NF em relação às variáveis sócio-demográficas, tabagismo e condições periodontais	33
Tabela 5.2- Comparação entre F e NF em relação à contagem das bactérias (log)	34
Tabela 5.3- Correlação entre PCS dos sítios de coleta e níveis dos periodontopatógenos (log)	35
Tabela 5.4- Correlação entre consumo de cigarros (maços / anos de vida) reportado e os níveis de CO expirado com os níveis dos periodontopatógenos (log) em F	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Nucleotídeo adenina
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AAP	American Academy of Periodontology / Academia Americana de Periodontia
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. forsythus</i>	<i>Bacteroides forsythus</i>
CO	Monóxido de carbono
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
Ct	Cycle Threshold / Ciclo limiar
MG-JEC	Distância da margem gengival à junção esmalte-cemento
DNA	Desoxyribonucleic acid / ácido desoxirribonucleico
<i>D. pneumosintes</i>	<i>Dialister pneumosintes</i>
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
G	Nucleotídeo guanina
NCI	Nível clínico de inserção
PBS	Phosphate – bufferid saline / Tampão salino fosfato
PCR	Polymerase chain reaction / Reação em cadeia da polimerase
PCS	Profundidade clínica de sondagem
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. micra</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>P. nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
ppm	Partes por milhão
rRNA	Ribossomal ribonucleic acid / ácido ribonucleico ribossômico

SS

Sangramento à sondagem

T

Nucleotídeo timina

T. denticola

Treponema denticola

T. forsythia

Tannerella forsythia

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	unidade de medida referente a milímetro
ml	unidade de medida referente a mililitro
°C	unidade de temperatura referente a Graus Celsius
µl	unidade de medida referente a microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Microbiota periodontal em fumantes	17
2.2 PCR em tempo real	21
3 PROPOSIÇÃO	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Seleção da amostra	25
4.2 Registro dos parâmetros clínicos	26
4.3 Avaliação do tabagismo	26
4.4 Coleta das amostras clínicas.....	27
4.5 Avaliação microbiológica.....	27
4.5.1 Extração do DNA das amostras clínicas	28
4.5.2 Procedimento para obtenção dos controles para quantificação	28
4.5.3 Realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (PCR em tempo real)	29
4.6 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	33
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO	49

1 INTRODUÇÃO

O fumo é considerado um dos mais importantes fatores de risco da doença periodontal (Bergstrom et al., 2000; Tomar; Asma, 2000; Corraini et al., 2008). Diversas revisões têm proposto mecanismos biológicos que tentam explicar por que fumantes apresentam maior prevalência, extensão e severidade de periodontite do que não fumantes (Palmer et al., 2005; Johnson; Guthmiller, 2007). Uma possível explicação seria a alteração na composição da microbiota subgengival destes indivíduos, principalmente na presença e quantidade de espécies consideradas “verdadeiros agentes etiológicos” das doenças periodontais: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (American Academy of Periodontology, 1996; Ezzo; Cutler, 2003; Holt; Ebersole, 2005; Tanner; Izard, 2006); e com aquelas que compõem o “complexo vermelho”, como *Treponema denticola*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* (Socransky et al., 1998; Holt; Ebersole, 2005). Entretanto, o mecanismo detalhado desta mudança no perfil microbiano em tabagistas ainda não está muito bem estabelecido, necessitando de um estudo do perfil qualitativo e quantitativo da microbiota subgengival para delinear uma relação com a manifestação clínica.

Os dados reportados na literatura sobre o efeito do fumo na microbiota periodontal são inconsistentes. Alguns estudos não encontraram diferenças entre fumantes e não fumantes em relação à composição da sua microbiota (Boström et al., 2001; Salvi et al., 2005; Apatzidou et al., 2005), enquanto outros trabalhos demonstraram alta prevalência ou quantidades de periodontopatógenos em fumantes (Haffajee; Socransky, 2001; van Winkelhoff et al., 2001; Gomes et al., 2006; Shchipkova et al., 2010; Heikkinen et al., 2012). As diferenças na sensibilidade e especificidade dos métodos microbiológicos utilizados, como a cultura (van Winkelhoff et al., 2001), sondas de DNA (Schiloah et al., 2000), reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Apatzidou et al., 2005; Shchipkova et al., 2010), PCR em tempo real (Gomes et al., 2006), *checkerboard DNA-DNA hybridization* (Boström et al., 2001; Haffajee; Socransky, 2001; Salvi et al., 2005), e suas limitações, podem explicar estes achados conflitantes. PCR em tempo real é uma técnica molecular

com alta sensibilidade e especificidade, e permite não só uma análise qualitativa, mas também quantitativa da microbiota.

Há também evidências de que as espécies dos complexos vermelho e laranja estão fortemente relacionadas com a profundidade de bolsa (Socransky; Haffajee, 2005). Sítios mais profundos possuem maior área de superfície epitelial, onde patógenos como *P. gingivalis* e *T. denticola* podem aderir (Kigure et al., 1995). Adicionalmente, a zona de bactérias fracamente aderidas, que parece conter grandes proporções de espécies patogênicas, é maior em sítios profundos (Noiri et al., 1997).

Existe apenas um estudo que comparou fumantes e não fumantes em relação à composição da microbiota subgengival utilizando PCR em tempo real (Gomes et al., 2006). Nenhum trabalho, porém, pareou os sujeitos pela profundidade clínica de sondagem (PCS), um fator crítico para a composição microbiana (Socransky et al., 1991; Ximénez-Fyvie et al., 2000; Colombo et al., 2002). Assim, o objetivo deste estudo transversal é verificar a presença e quantidade de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* no biofilme subgengival de fumantes e não fumantes, através da PCR em tempo real.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota periodontal em fumantes

O tabagismo é considerado um dos mais importantes fatores de risco da doença periodontal (American Academy of Periodontology, 2005; Johnson; Guthmiller, 2007). A associação entre tabagismo e periodontite tem sido demonstrada de maneira consistente por estudos transversais (Tomar; Asma, 2000; Corraini et al., 2008) e longitudinais (Bergström et al., 2000; Buchwald et al., 2013).

Uma possível explicação para a maior prevalência e severidade de periodontite em fumantes seria a alteração qualitativa e quantitativa da microbiota provocada pelo tabagismo (Palmer et al., 2005). Alguns estudos propuseram a analisar e comparar a composição do biofilme subgengival destes indivíduos, através de distintas metodologias, e encontraram diferenças significativas na composição do biofilme subgengival entre estes dois grupos.

Através de microscopia de imunofluorescência indireta, Zambon et al. (1996) analisaram o biofilme subgengival de 1426 voluntários, fumantes e não fumantes. O risco de infecção subgengival por *Bacteroides forsythus* foi 2,3 vezes maior em tabagistas, e *P. gingivalis* também se mostrou mais frequente nestes pacientes.

Em 1999, Kamma et al. se propuseram a avaliar a microbiota periodontal de fumantes e não fumantes com periodontite de acometimento precoce. A análise de um *pool* de amostras subgengivais através de cultura anaeróbica revelou que diversas espécies, dentre elas *P. gingivalis*, foram mais frequentemente detectadas em fumantes.

No ano seguinte, Shiloah et al. (2000) realizaram um estudo com 25 fumantes e 25 não fumantes sem doença periodontal, pareados por sexo, idade e índice de placa. O objetivo foi determinar a prevalência de oito periodontopatógenos (*P. gingivalis*, *A. actinomycetencomitans*, *B. forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* e *T.*

denticola), utilizando sondas de DNA. Os resultados mostraram que fumantes apresentaram 18 vezes maior risco de exibir os patógenos estudados do que grupos não fumantes. Além disso, a colonização dos sulcos pelas espécies patogênicas esteve relacionada com a quantidade de cigarros e duração do tabagismo.

No estudo conduzido por Haffajee e Socransky (2001), foram coletadas amostras de placa bacteriana subgingival da face mesial de todos os dentes, de 272 sujeitos. Utilizando a técnica de *checkerboard DNA-DNA hybridization* (ensaio de hibridização com sondas de DNA marcadas com digoxigenina) foram analisadas 29 espécies subgingivais. A maior diferença entre a microbiota subgingival em sujeitos com diferentes históricos de tabagismo, se deu em relação à prevalência das espécies. Os periodontopatógenos estudados colonizavam uma maior proporção de sítios em fumantes do que em não fumantes. Esta diferença na prevalência das espécies bacterianas ajudou a explicar a maior severidade da destruição periodontal nos indivíduos fumantes.

Através da técnica de cultura anaeróbica, van Winkelhoff et al. (2001) estudaram adultos com periodontite, fumantes e não fumantes. Os fumantes não tratados apresentaram maiores prevalências de *Peptostreptococcus micros*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*. Após tratamento, o grupo de fumantes mostrou maior prevalência de *B. forsythus*, *P. micros* e *F. nucleatum*.

A PCR foi empregada no estudo conduzido por Shchipkova et al. (2010), para analisar o perfil microbiano de 15 fumantes e 15 não fumantes com periodontite, pareados por sexo e idade. Os resultados mostraram que o perfil microbiano de fumantes com periodontite foi distinto ao daqueles que não fumavam, com diferenças significativas na prevalência e abundância de espécies associadas à doença: *Parvimonas*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Bacterioides*, *Treponema*, *Peptostreptococci*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter gracilis*, *Treponema socranskii*, *Dialister pneumosintes* e *T. forsythia*.

No ano seguinte, Kumar et al. (2011) também conduziu um estudo no qual acompanhou sete dias de formação de placa em 15 fumantes e 15 não fumantes sem periodontite. A análise microbiológica foi realizada com técnicas moleculares, através de clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA, para identificação das

espécies. Foi observada maior diversidade de espécies nos fumantes, e o tabagismo foi capaz de influenciar a composição bacteriana durante todos os estágios de desenvolvimento da placa bacteriana. Durante o período de observação, fumantes adquiriram mais bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* e *Treponema*, com diferença estatisticamente significativa em comparação aos não fumantes.

Utilizando técnica de biologia molecular, Heikkinen et al. (2012) analisou a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *T. denticola*, em 264 adolescentes. Um pool de amostras subgengivais foi avaliada pela PCR, e observou-se uma maior prevalência de *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. nigrescens* e *P. intermedia* em tabagistas. A frequência destas bactérias também se mostrou proporcional à duração e quantidade do hábito.

Em contrapartida, alguns trabalhos relatam não haver diferenças entre indivíduos fumantes e não fumantes na detecção de periodontopatógenos, e sugerem que o tabagismo tem pouco impacto na composição da microbiota subgengival.

Preber et al. (1992), em um estudo com 142 indivíduos com periodontite, concluiu que as contagens e detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* e *P. intermedia* não foram significativamente diferentes entre fumantes e não fumantes, baseado em uma única coleta de placa subgengival por sujeito, de bolsas ≥ 6 mm.

Stoltenberg et al. (1993) investigaram a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *E. corrodens* e *F. nucleatum* em 189 adultos, fumantes e não fumantes pela técnica de imunoensaio. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na prevalência de nenhuma das cinco bactéria avaliadas, entre os dois grupos.

Através da PCR, Darby et al. (2000) investigaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* e *T. denticola* em placa subgengival de 57 indivíduos com periodontite. Os autores também não encontraram diferenças estatisticamente significantes na prevalência destas espécies entre fumantes e não fumantes.

Para a detecção de 12 periodontopatógenos, Boström et al. (2001) utilizaram a técnica de *checkerboard DNA-DNA hybridization*. Coletas de placa subgengival dos 64 indivíduos foram realizadas com cones de papel endodôntico, em quatro bolsas distintas. Após processamento microbiológico, não foram observadas diferenças nas taxas de detecção das espécies entre fumantes e não fumantes. Os autores concluíram que o fumo exerce pouca ou nenhuma influência na ocorrência dos micro-organismos analisados.

Salvi et al. (2005) realizaram um estudo, utilizando o modelo de gengivite experimental, com objetivo de verificar as alterações na microbiota subgengival de fumantes e não-fumantes durante os primeiros estágios de formação de placa. Para tanto, os autores utilizaram a técnica de *checkerboard DNA-DNA hybridization*. Durante um período de 3 semanas de acúmulo ininterrupto de placa, em 11 fumantes e 11 não fumantes com gengivite ou saúde periodontal, não foi observada diferença entre os dois grupos com relação aos parâmetros microbiológicos. Após 21 dias, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes no aumento da contagem total de DNA bacteriano. Além disso, a composição dos complexos microbianos não diferiu entre os grupos. Conseqüentemente, a colonização bacteriana inicial em fumantes e não fumantes parece ter a mesma magnitude.

Apatzidou et al., em 2005, avaliaram a presença de *A. actinomycetencomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* e *T. denticola* em 40 pacientes com periodontite crônica pela PCR. Os autores concluíram que não há diferenças significativas na composição da microbiota subgengival de fumantes e não fumantes.

Com a mesma técnica microbiológica, Kubota et al. (2011) avaliaram a relação entre o tabagismo e a detecção de *A. actinomycetencomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum / periodonticum*, *T. denticola* e *C. rectus* em amostras subgengivais. Foram selecionados 67 indivíduos japoneses com periodontite crônica, fumantes e não fumantes. Neste estudo, a colonização por *C. rectus* foi maior nos fumantes, enquanto que a colonização por *A. actinomycetencomitans* foi menor neste grupo. Com relação aos outros periodontopatógenos estudados, todavia, não houve diferenças na detecção entre fumantes e não fumantes.

2.2 PCR em tempo real

Os achados conflitantes reportados pelos estudos acima podem ser explicados por variações nas técnicas de coleta, transporte, análise microbiológica e até mesmo apresentação dos dados (Johnson; Guthmiller, 2007). Também devem ser consideradas as falhas e limitações inerentes a alguns métodos de diagnóstico microbiológico, tais como a microscopia de imunofluorescência indireta (Zambon et al., 1996) e as sondas de DNA (Shiloah et al., 2000; Böstrom et al., 2001; Salvi et al., 2005).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) tem se mostrado um método sensível e específico para a avaliação microbiológica do biofilme bacteriano, possibilitando tanto uma análise quantitativa quanto qualitativa (Lau et al., 2004; Boutaga et al., 2007; Jervøe-Storm et al., 2005; Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2008).

O emprego da PCR em tempo real em estudos periodontais é justificado por sua alta sensibilidade e especificidade na identificação e quantificação de microrganismos em amostras de placa bacteriana (Lau et al., 2004). Alguns estudos foram feitos com o intuito de se comparar a eficácia deste método com outros consolidados ao longo dos anos na literatura, principalmente com o método de cultura, considerado “padrão ouro” (Lau et al., 2004; Loomer, 2004; Jervøe-Storm et al., 2005; Boutaga et al., 2007).

Em 2004, Lau et al. publicaram um estudo no qual se propuseram a validar o ensaio de PCR em tempo real, comparando-o com procedimentos de cultura convencionais, para identificar e quantificar: *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis* e *P. gingivalis*. Um pool de amostras subgingivais de 92 indivíduos foi obtido. Na detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, ambas as técnicas obtiveram excelente concordância, e em relação à *T. forsythensis*, a PCR em tempo real apresentou maior sensibilidade de detecção. Os autores salientam que a alta sensibilidade e especificidade da técnica de PCR em tempo real justificam seu uso em estudos epidemiológicos.

Jervøe-Storm et al. (2005), que também compararam as duas modalidades de diagnóstico, encontraram uma excelente concordância na detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, em amostras de placa bacteriana subgingival, sendo que uma boa concordância foi detectada em relação a *T. forsythensis*.

Se maneira semelhante, Boutaga et al. (2007) compararam PCR em tempo real com cultura anaeróbica quantitativa para detecção e quantificação de cinco importantes espécies periodontopatogênicas: *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *P. micros* e *Fusobacterium* spp. O pool de amostras subgingivais de 259 pacientes com periodontite foi analisado com ambas as técnicas. A PCR em tempo real indicou elevado grau de concordância com os resultados de cultura, além de apresentar economia de tempo de trabalho, rápida identificação e quantificação dos cinco patógenos testados.

A PCR em tempo real vem sendo bastante aplicada e tem tido enorme utilidade para o estudo de agentes microbianos em doenças infecciosas, ajudando no diagnóstico dos processos de doença (Kubista et al., 2006). Na periodontia, estudos recentes utilizaram a técnica da PCR em tempo real para a investigação da microbiota periodontal em tabagistas (Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2008; Teixeira et al., 2009).

No estudo de Gomes et al. (2006), foram coletadas amostras de biofilme subgingival de 25 fumantes e 25 não fumantes com periodontite crônica, não pareados. Foi realizada avaliação microbiológica das amostras através da PCR em tempo real. Não houve diferença na contagem *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, entre os dois grupos estudados. Em contrapartida, os números de *Micromonas micros* e *D. pneumosintes* foram significativamente mais altos nos fumantes. Os autores foram capazes de identificar uma relação positiva entre o grau do tabagismo e a quantidade de bactérias e profundidade de sondagem.

Teixeira et al. (2009) se propuseram a investigar a correlação dos níveis de *P. gingivalis* *fimA* genótipos II e IV, com a PCS em fumantes com doença periodontal crônica. Amostras de placa subgingival de diferentes PCS foram coletadas de 20 sujeitos, e quantificadas pela PCR em tempo real. Um elevado nível do genótipo IV

esteve associado com o aumento da PCS, o que sugere uma associação entre *P. gingivalis* *fimA* genótipo IV e a severidade da doença periodontal em fumantes.

Mais estudos são necessários para se avaliar as diferenças na microbiota de fumantes e não fumantes, utilizando métodos sensíveis e precisos, como a PCR em tempo real quantitativo.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo transversal é verificar a presença e quantidade de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* no biofilme subgingival de fumantes e não fumantes, através da técnica da PCR em tempo real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra

Este estudo transversal foi conduzido com uma amostra de conveniência composta por pacientes que procuraram tratamento na Disciplina de Periodontia da Universidade de São Paulo, São Paulo, entre 2009 e 2012. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (Anexo A). Foi obtido consentimento livre e esclarecido de todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa.

Foi aplicado um questionário para coleta de informações a todos os potenciais sujeitos de pesquisa. Os voluntários eram considerados não elegíveis se apresentassem:

- a) gravidez;
- b) doenças ou condições que pudessem alterar o desenvolvimento da doença periodontal;
- c) uso de anti-inflamatórios;
- d) história de tratamento periodontal recente e/ou antibioticoterapia nos seis meses antecedentes 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 10 dentes (excluindo terceiros molares);
- b) Doença periodontal destrutiva, definida como a perda de inserção interproximal $\geq 5\text{mm}$ em pelo menos 30% dos dentes (Tonetti, Claffey, 2005).

Foram incluídos consecutivamente quarenta fumantes (F) que preenchessem os critérios de elegibilidade. Em seguida, foram incluídos consecutivamente quarenta não fumantes (NF), pareados com os fumantes por sexo, idade e profundidade clínica de sondagem dos sítios de coleta microbiológica.

4.2 Registro dos parâmetros clínicos

Um exame periodontal completo foi realizado com o auxílio de uma sonda periodontal manual. 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)

4.3 Avaliação do tabagismo

Os níveis de monóxido de carbono (CO) expirado foram aferidos pelo Micromedidor de CO (Micromedical Ltd, Kent, Reino Unido), aparelho portátil que apresenta uma célula sensora de combustível eletroquímico, que funciona por meio da reação do monóxido de carbono com um eletrólito em um eletrodo e oxigênio do ar ambiente em outro eletrodo. A aferição dos níveis de CO expirado é um método simples e de baixo custo, que tem sido usado em estudos com fumantes (Ahluwalia et al., 2006; Cropsey et al., 2006; Campbell et al., 2006), para confirmar o *status* de

tabagista do indivíduo. A medição do CO (ppm) permite classificar o indivíduo em não fumante (0-6ppm), fumante leve (7-10ppm) e fumante pesado (11-72 ppm).

4.4 Coleta das amostras clínicas

Para cada indivíduo, foram coletadas quatro amostras de placa subgengival, cada uma correspondente ao sítio com maior PCS de cada quadrante (Mombelli e al., 1991).

As coletas foram realizadas na semana seguinte após o exame periodontal de triagem. Para a coleta da placa subgengival, foi feito isolamento relativo dos dentes com roletes de algodão. O biofilme supragengival foi removido com curetas de Gracey, e a amostra de biofilme subgengival foi obtida introduzindo-se pontas de papel absorventes estéreis (Tanari #30) no interior da bolsa periodontal, sendo mantidas em posição por 30 segundos (Hartroth et al., 1999). As quatro pontas de papel de cada indivíduo foram então transferidas para o interior de um único microtubo de 1,5 ml estéril, devidamente identificado. Os tubos contendo o *pool* de amostras dos quatro sítios de coleta foram estocados à -20°C, até a extração de DNA bacteriano.

4.5 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 USP, sob orientação do Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata.

4.5.1 Extração de DNA das amostras clínicas

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

Para se melhorar a qualidade da extração do material genético presente nos cones de papel absorvente, foi adicionado 200µl de solução tampão PBS nos microtubos contendo os cones de papel. Estes foram esmagados, submersos na solução, e mantidos sob agitação por 12 horas.

Após este preparo inicial, 20µl de proteinase K e 200µl de buffer AL presentes no kit de extração, foram adicionados aos microtubos, que ficaram encubados por 10 minutos a 56°C. Em seguida, adicionou-se 300µl de etanol e iniciou-se um ciclo de repetidas centrifugações e adições de solução tampão, conforme protocolo do fabricante. Ao final, o DNA extraído ficou eluído em solução tampão.

4.5.2 Procedimento para obtenção dos controles para quantificação

O procedimento de clonagem e os plasmídeos recombinantes contendo os fragmentos gênicos de interesse dos periodontopatógenos a serem avaliados foram desenvolvidos durante o estudo de Lourenção (2010).

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

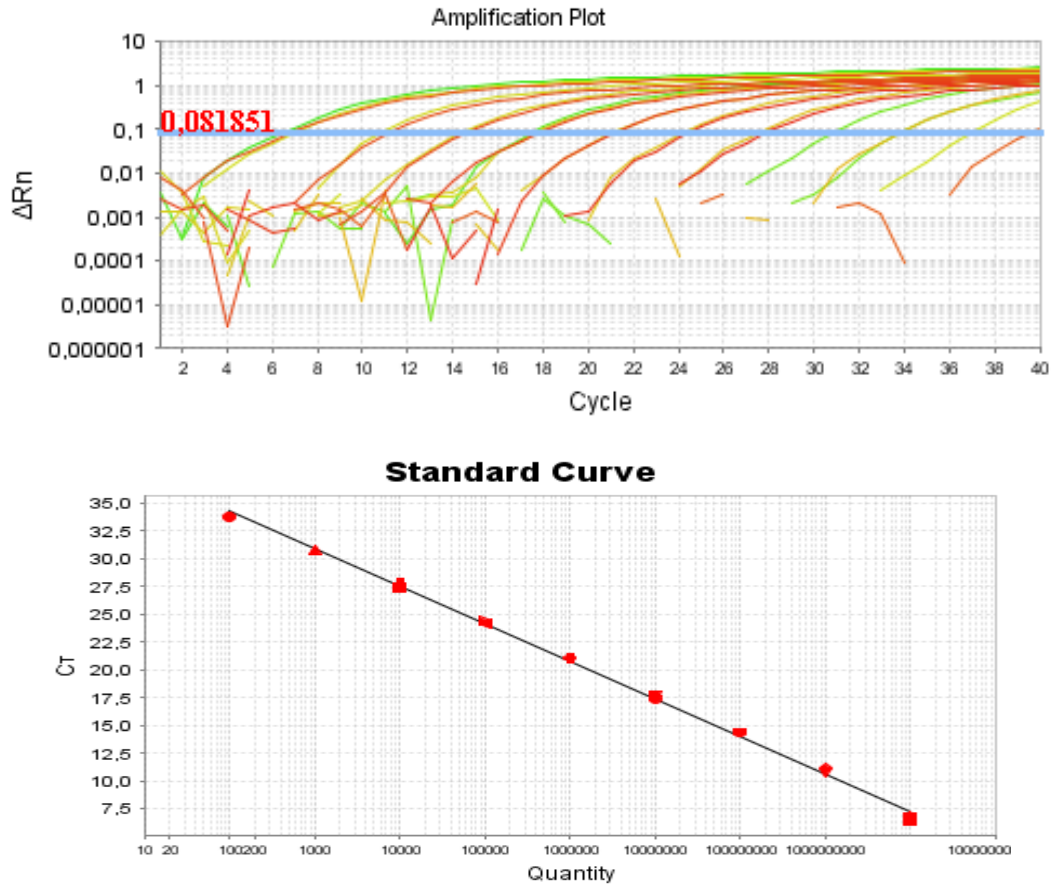


Figura 4.1 – Exemplo de curva padrão para a bactéria *A. actinomycetemcomitans*

4.5.3 Realização da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (PCR em tempo real)

A identificação e quantificação das bactérias *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *A. actinomycetemcomitans* no material genético extraído das amostras de placa subgengival foram realizadas pela PCR em tempo real utilizando o sistema Taqman® com detecção pela ABI PRISM Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). A PCR em tempo real foi realizada utilizando uma solução de 20 μ l, contendo 6,5 μ l de água estéril, 10,0 μ l de TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,5 μ l de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,5 μ l de sonda TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 2 μ l do DNA extraído. A reação de amplificação foi realizada com as

seguintes etapas: 20 segundos de desnaturação inicial a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificação a 95°C por 1 segundo, e 60°C por 20 segundos.

Os iniciadores e as sondas escolhidos foram baseados nas regiões espécie-específicas altamente conservadas do gene 16S rRNA, através do uso do programa *Primer ExpressTM* (Applied Biosystems, Foster City, CA) e suas 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/>). As sequências de todos dos iniciadores e sondas utilizados podem ser vistas na tabela 4.1.

As diluições seriadas 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. Todas as amostras clínicas foram processadas pela PCR em tempo real juntamente com a curva padrão (controle positivo) respectiva de cada espécie bacteriana, em triplicatas, e os valores médios foram utilizados para o cálculo dos níveis bacterianos. As reações foram realizadas respeitando-se uma eficiência de amplificação para a curva padrão entre 110% a 93% (*slope* = -3,10 a -3,50) e um coeficiente de correlação (R^2) $\geq 0,98$. Para o ensaio da PCR em tempo real ter alta eficiência, a inclinação da curva padrão (*slope*) deve ser próxima de -3,30 (Livak, Schmittgen, 2001).

Tabela 4.1 - Sequências dos iniciadores e sondas

Bactéria*	Sequência (5'-3')	Cepa ATCC	Nº acesso
<i>Pg</i>		49417	AF118634
<i>Senso</i>	ACC TTA CCC GGG ATT GAA ATG		
<i>anti-senso</i>	CAA CCA TGC AGC ACC TAC ATA GAA		
<i>Sonda</i>	ATG ACT GAT GAT GGT GAA AAC CGT CTT CCC TTC		
<i>Td</i>		ATCC 33521	AJ277354
<i>Senso</i>	CCG AAT GTG CTC ATT TAC ATA AAG GT		
<i>anti-senso</i>	GAT ACC CAT CGT TGC CTT GGT		
<i>Sonda</i>	TGA GTA ACG CGT ATG TAA CCT GCC CGC		
<i>Tf</i>		ATCC 43037	AM039448
<i>Senso</i>	AGC GAT GGT AGC AAT ACC TGT C		
<i>anti-senso</i>	TTC GCC GGG TTA TCC CTC		
<i>Sonda</i>	CCG CGA CGT GAA ATG GTA TTC CTC		
<i>Aa</i>		ATCC 29522	AB017807
<i>Sense</i>	GCA GGA TCC ATA TTA AAT CTC CTT GT		
<i>anti-sense</i>	GCG GTC GAC AAC CTG ATA ACA GTA TT		
<i>Sonda</i>	CAC TTA AAG GTC CGC CTA CGT GCC		

**Pg*=*Porphyromonas gingivalis*, *Tf*=*Tannerella forsythia*, *Td*=*Treponema denticola*, *Aa*=*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.6 Análise estatística

Os F foram comparados aos NF em relação às variáveis demográficas. A associação entre grupo e presença dos periodontopatógenos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* foi verificada por meio do teste qui-quadrado. A contagem das bactérias foi transformada em log, e a média dos patógenos foi comparada entre os grupos através do teste t de Student. Foi verificado se havia correlação entre a PCS e a quantidade de periodontopatógenos, por meio do teste de correlação de Pearson. Foi avaliada também a correlação entre a exposição ao tabagismo e a quantidade dos patógenos periodontais.

Todos os testes foram realizados considerado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

A tabela 5.1 descreve a distribuição dos sujeitos da pesquisa em relação aos grupos, variáveis demográficas e condição periodontal. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à sexo, idade e média da PCS dos sítios de coleta. Entretanto, considerando-se todos os sítios da cavidade bucal, indivíduos do grupo F apresentaram maior média de PCS ($p = 0,001$) e NCI ($p = 0,006$) e menos SS ($p = 0,001$).

Tabela 5.1 – Comparação entre F e NF em relação às variáveis sócio-demográficas, tabagismo e condições periodontais

Variáveis	F	NF	P
N	40	40	
N Mulheres	26	26	
Idade (anos)	47,53 (7,80)	46,23 (9,04)	0.49
N maços / dia	0.53 (0,53)	-	-
Anos de hábito	30,55 (8,47)	-	
Média CO (ppm)	10,48 (5,06)	-	
PCS sítios de coleta	6,06 (0,92)	6,04 (0,94)	0.90
PCS boca toda	3,44 (0,71)	3,03 (0,56)	0.001*
NCI boca toda	4,43 (1,35)	3,48 (0,76)	0.006*
SS boca toda	31,67 (20,29)	56,58 (24,80)	0.001*

Foi observada associação entre tabagismo e presença de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0.001$). Não houve associação entre tabagismo e a presença de *P. gingivalis* ($p = 0,108$), *T. forsythia* ($p = 0,556$) e *T. denticola* ($p = 0,396$) (Figura 5.1).

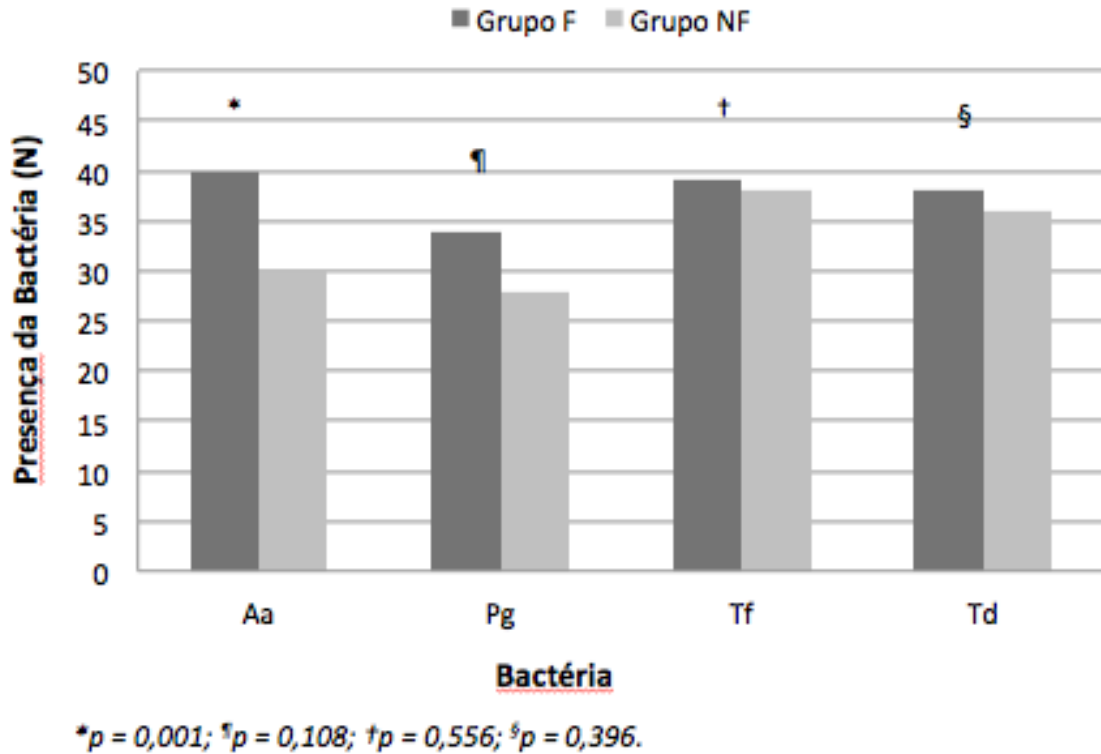


Figura 5.1 - Presença de *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *P. gingivalis* (Pg), *T. forsythia* (Tf) e *T. denticola* (Td), nos pacientes dos grupos F e NF

As contagens de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,001$), *P. gingivalis* ($p = 0,042$) e *T. forsythia* ($p < 0,001$) foram significativamente maiores no grupo F do que no grupo NF (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Comparação entre F e NF em relação à contagem das bactérias (log)

Variáveis	F	NF	p
N	40	40	
Aa	5,28	4,03	< 0.001*
Pg	4,45	3,70	0.042*
Tf	5,36	4,20	< 0.001*
Td	5,36	5,04	0,15

Aa = *A. actinomycetemcomitans*, Pg = *P. gingivalis*, Tf = *T. forsythia*, Td = *T. denticola*

Uma associação significativa, porém fraca, foi observada entre a PCS dos sítios de coleta e as contagens de *A. actinomycetemcomitans* ($r = 0,37$), *P. gingivalis* ($r = 0,28$) e *T. forsythia* ($r = 0,24$), quando todos os pacientes foram considerados. Quando apenas indivíduos do grupo F foram analisados, uma associação significativa fraca foi observada entre PCS dos sítios de coleta e as contagens de *P. gingivalis* ($r = 0,22$), e moderada para *A. actinomycetemcomitans* ($r = 0,37$) e *T. forsythia* ($r = 0,35$). Em relação ao grupo NF, foi encontrada uma correlação significativa fraca entre PCS e níveis de *T. forsythia* ($r = 0,21$), correlação significativa moderada entre PCS e contagens de *A. actinomycetemcomitans* ($r = 0,35$) e uma correlação significativa forte entre PCS e as contagens de *P. gingivalis* ($r = 0,41$) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Correlação entre PCS dos sítios de coleta e níveis dos periodontopatógenos (log)

Grupo	Aa	Pg	Tf	Td
F e NF (n = 80)	r = 0,37 (p=0,002*)	r = 0,28 (p=0,030*)	r = 0,24 (p=0,037*)	r = 0,11 (p=0,34)
F (n = 40)	r = 0,37 (p=0,020*)	r = 0,22 (p=0,207)	r = 0,35 (p=0,031*)	r = 0,05 (p=0,76)
NF (n = 40)	r = 0,35 (p=0,055)	r = 0,41 (p=0,029*)	r = 0,21 (p=0,193)	r = 0,23 (p=0,180)

Aa = *A. actinomycetemcomitans*, Pg = *P. gingivalis*, Tf = *T. forsythia*, Td = *T. denticola*

Também foi verificado se havia correlação entre a exposição ao tabagismo e os níveis dos periodontopatógenos. Para tanto, foi utilizado o consumo de cigarros (maços / anos de vida, calculado pelo número de maços fumados por dia x anos de hábito) reportado pelos participantes da pesquisa, e os níveis de CO expirado aferidos no exame inicial. Foi verificada correlação significativa apenas entre os níveis de CO expirado e as contagens de *P. gingivalis*, sendo que esta correlação foi forte ($r = 0,43$) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Correlação entre consumo de cigarros (maços / anos de vida) reportado e os níveis de CO expirado com os níveis dos periodontopatógenos (log) em F

	Aa	Pg	Tf	Td
Maços / anos de vida (n = 40)	r = 0,08 (p=0,59)	r = 0,09 (p=0,58)	r = 0,17 (p=0,30)	r = 0,19 (p=0,24)
CO expirado (ppm) (n = 40)	r = 0,30 (p=0,06)	r = 0,43 (p=0,01*)	r = 0,03 (p=0,84)	r = 0,16 (p=0,32)

Aa = *A. actinomycetencomitans*, Pg = *P. gingivalis*, Tf = *T. forsythia*, Td = *T. denticola*

6 DISCUSSÃO

O presente estudo comparou fumantes e não fumantes com periodontite crônica em relação a presença e quantidade de patógenos periodontais. Foi observada associação entre tabagismo e presença de *A. actinomycetemcomitans*. As médias das contagens de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* foram significativamente maiores nos fumantes.

Na análise microbiológica para detecção das espécies, somente *A. actinomycetemcomitans* esteve associada com o tabagismo. Considerando-se apenas os estudos que avaliaram pacientes com periodontite crônica, este dado está de acordo com os achados de Zambon et al. (1996), que demonstraram que *A. actinomycetemcomitans* também foi mais frequentemente detectada em fumantes. *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, por outro lado, não mostraram associação com o hábito de fumar, corroborando os dados de estudos anteriores (Darby et al., 2000; Boström et al., 2001; Apatzidou et al., 2005; Gomes et al., 2006; Kubota et al., 2011).

Por outro lado, foi reportada na literatura associação entre tabagismo e a presença de *P. gingivalis* (Zambon et al., 1996) e *T. forsythia* (Zambon et al., 1996; van Wilkelhoff et al., 2001; Shchipkova et al., 2010) em pacientes com periodontite crônica. Alguns estudos que analisaram a presença de *A. actinomycetemcomitans* não mostraram diferenças de detecção entre fumantes e não fumantes (Boström et al., 2001; van Wilkelhoff et al., 2001; Apatzidou et al., 2005; Gomes et al., 2006).

A técnica de PCR em tempo real permite ainda quantificar as espécies reveladas nas amostras clínicas. Os resultados da nossa investigação estão de acordo com outros estudos, que utilizaram diferentes técnicas microbiológicas, e demonstraram que tabagistas apresentam um perfil microbiano subgingival distinto dos indivíduos não fumantes. Maiores contagens de micro-organismos relacionados às doenças periodontais foram observadas em fumantes. No presente trabalho, os níveis de *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* estavam aumentados neste grupo. De maneira similar, no estudo de Zambon et al. (1996) os autores também encontraram maiores contagens de *A. actinomycetemcomitans* nos

tabagistas. Foram reportados ainda números significativamente maiores de *T. forsythia* nos fumantes em outras publicações (Zambon et al., 1996; Haffajee e Socransky, 2001; Shchipkova et al., 2010). Zambon et al. (1996) reportaram resultados semelhantes em relação à *P. gingivalis*. No trabalho de Haffajee e Socransky (2001), os fumantes apresentaram maiores porcentagens de sítios colonizados por esta espécie.

Por outro lado, algumas investigações não encontraram diferenças nas contagens de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* entre fumantes e não fumantes (Eggert et al., 2001; Gomes et al., 2006).

Dentre as possíveis explicações para esses achados conflitantes, está a variedade de metodologias empregadas para detecção de micro-organismos. Cada técnica possui sensibilidades e especificidades diferentes, e limiares de detecção distintos (Loomer, 2004). Dentre os diversos métodos microbiológicos utilizados anteriormente, destacam-se as técnicas de cultura (Preber et al., 1992; Kamma et al., 1999; van Winkelhoff et al., 2001), imunofluorescência (Stoltenberg et al., 1993; Zambon et al., 1996), sondas de DNA (Shiloah et al., 2000), PCR (Darby et al., 2000; Apatzidou et al., 2005; Shchipkova et al., 2010; Kubota et al., 2011; Kumar et al., 2011; Heikkinen et al., 2012) e *checkerboard DNA-DNA hybridization* (Boström et al., 2001; Haffajee; Socransky, 2001; Salvi et al., 2005). A identificação de micro-organismos através de diferentes metodologias pode dar origem a resultados potencialmente diferentes. A PCR em tempo real é considerada uma técnica sensível, específica (Boutaga et al., 2007) e versátil para avaliação microbiológica de amostras subgengivais (Morillo et al., 2004). Além disso, tal método permite avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota subgengival (Lau et al., 2004). Outra explicação para tais resultados contraditórios encontrados na literatura, está baseada no fato de que o perfil microbiano subgengival da população exibe diferenças consideráveis entre os diversos países (Haffajee et al., 2004).

Os métodos em que as coletas de placa bacteriana subgengival são realizadas também variam amplamente entre os estudos, podendo também dar margem aos resultados microbiológicos conflitantes observados. Basicamente, há duas maneiras consolidadas na literatura para coleta do biofilme subgengival para detecção de patógenos periodontais (Loomer, 2004): remoção com curetas

(Stoltenberg et al., 1993; Darby et al., 2000; Haffajee; Socransky, 2001; Apatzidou et al., 2005; Salvi et al., 2005) ou adsorção por cones de papel absorvente (Preber et al., 1992; Zambon et al., 1996; Kamma et al., 1999; Shiloah et al., 2000; Boström et al., 2001; van Winkelhoff et al., 2001; Gomes et al., 2006; Shchipkova et al., 2010; Kubota et al., 2011; Kumar et al., 2011; Heikkinen et al., 2012). Estas duas metodologias podem chegar a resultados de análise microbiológica conflitantes, uma vez que a cureta coleta a placa de toda a bolsa periodontal, enquanto que as pontas de papel absorvente adsorvem as camadas mais externas do biofilme, que contém uma microbiota mais patogênica (Socransky; Haffajee, 2002; Loomer, 2004). As pontas de papel contêm maiores proporções de bactérias patogênicas quando comparadas às amostras obtidas com o uso de curetas (Renvert et al., 1992), o que evidencia a vantagem em se utilizar este dispositivo para as coletas subgengivais.

Nesta investigação, foi observada uma forte correlação entre as contagens de *P. gingivalis* e os níveis de CO aferidos pelo monoxímetro, o que nos leva a inferir que a intensidade do hábito de fumar influencia diretamente nos níveis deste periodontopatógeno.

Interessantemente, tal correlação não foi verificada quando utilizamos os dados auto-relatados pelo paciente. Este resultado aponta uma discordância entre os níveis de CO aferidos e os dados coletados através do auto-relato, que tem se mostrado um método pouco confiável (Scott et al., 2001; Spiekerman et al., 2003). Embora a maioria dos estudos com fumantes tenha utilizado o auto-relato para verificação do tabagismo (Stoltenberg et al., 1993; Zambon et al., 1996; Kamma et al., 1999; Shiloah et al., 2000; Haffajee; Socransky, 2001; van Winkelhoff et al., 2001; Boström et al., 2001; Salvi et al., 2005; Gomes et al., 2006; Shchipkova et al., 2010; Kubota et al., 2011; Heikkinen et al., 2012), deve ser lembrado que esse teste está associado com respostas falso-negativas. Por outro lado, a utilização do monoxímetro para validar o tabagismo é uma técnica prática, objetiva, não invasiva e que permite confrontar os dados com os reportados pelos sujeitos de pesquisa (MacLaren et al., 2010).

Há uma carência de estudos transversais que utilizaram PCR em tempo real para analisar a composição da microbiota de fumantes. De acordo com nossa busca na literatura, este é o primeiro estudo que comparou fumantes e não fumantes,

pareados por idade, sexo e PCS média dos sítios de coleta, com relação a presença e quantidade de patógenos periodontais, e utilizando a PCR em tempo real. A PCS é um fator que influencia a composição da microbiota subgengival (Socransky; Haffajee, 2005), especialmente a espécies dos complexos laranja e vermelho, que aumentam significativamente com o aumento da profundidade de bolsa (Socransky et al., 1991; Ximénez-Fyvie et al., 2000; Colombo et al., 2002). Portanto, no presente trabalho, fumantes e não fumantes foram pareados segundo a PCS dos sítios de coleta.

As diferenças entre fumantes e não fumantes com relação a presença e quantidade de patógenos periodontais podem estar relacionadas a alterações provocadas pelo tabagismo no ambiente subgengival. O fumo tem um efeito crônico a longo prazo em muitos aspectos importantes das respostas inflamatórias e imunológicas (Güntsch et al., 2006), podendo afetar a habilidade do hospedeiro em controlar a infecção (Haffajee; Socransky, 2001). Os mecanismos propostos para os efeitos negativos locais e sistêmicos do fumo incluem: supressão vascular e prejuízo na angiogênese, diminuição da viabilidade e funções neutrofílicas; alteração das funções fibroblásticas, com redução da produção de colágeno e também aumento da atividade da collagenase, além de alteração na resposta imune celular e humoral (Palmer et al., 2005; Johnson; Guthmiller, 2007). É possível que todos estes fatores contribuam para as mudanças no microbioma subgengival em fumantes. Estes efeitos do tabagismo poderiam justificar as altas taxas de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia* apresentadas pelo grupo F na presente investigação.

Evidências atuais também sugerem que o enriquecimento por patógenos ocorre ao longo das primeiras 24h da formação do biofilme em tabagistas (Kumar et al., 2011). Neste estudo, os autores concluíram que a exposição ao tabaco influencia na composição bacteriana durante todos os estágios do desenvolvimento da placa, sugerindo que o tabagismo aumenta a susceptibilidade à doença, por promover uma aquisição e colonização precoce por periodontopatógenos. Interessantemente, Haffajee e Socransky (2001) detectaram que a maior diferença na microbiota subgengival entre fumantes e não fumantes estava associada com PCS ≤ 4 mm, com maior frequência de *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* nos fumantes. Estes

achados sugerem que o tabagismo pode favorecer a colonização por patógenos em sítios rasos, e contribuir para o início da destruição periodontal.

Uma das dificuldades em se estabelecer o papel do fumo na alteração do biofilme subgengival está em demonstrar que o agente causal (fumo) antecede a condição (mudança no perfil microbiano). Em dois estudos longitudinais, mudanças puderam ser observadas no microbioma subgengival após a cessação de tabagismo (Fullmer et al., 2009; Delima et al., 2010). Portanto, mais estudos longitudinais com cessação de tabagismo são necessários, para que se possa comprovar de maneira conclusiva que o tabagismo está associado com alterações na microbiota subgengival

7 CONCLUSÕES

Fumantes apresentaram quantidades significativamente maiores de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia* do que os não fumantes. Houve uma associação significativa entre tabagismo e a presença de *A. actinomycetemcomitans*.

REFERÊNCIAS¹

Ahluwalia JS, Okuyemi K, Nollen N, Choi WS, Kaur H, Pulvers K, Mayo MS. The effects of nicotine gum and counseling among African American light smokers: a 2 x 2 factorial design. *Addiction*. 2006;101(6):883-91.

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

American Academy of Periodontology. Position Paper: Epidemiology of Periodontal Diseases *J Periodontol*. 2005 Aug;76(8): 1406-19.

Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32:973-83.

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

Bergström J, Eliasson S, Dock J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol*. 2000;71(8):1338-47.

Boström L, Bergstrom J, Dahlen G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001;28:212-9.

Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2007;78(1):79-86.

Buchwald S, Kocher T, Biffar R, Harb A, Holtfreter B, Meisel P. Tooth loss and periodontitis by socio-economic status and inflammation in a longitudinal population-based study. *J Clin Periodontol*. 2013 Mar;40(3):203-11.

Campbell E, Walsh RA, Sanson-Fisher R, Burrows S, Stojanovski E. A group randomised trial of two methods for disseminating a smoking cessation programme to public antenatal clinics: effects on patient outcomes. *Tob Control*. 2006 Apr;15(2):97-102.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

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;73(4):360-9.

Corraini P, Baelum V, Pannuti CM, Pustiglioni AN, Romito GA, Pustiglioni FE. Risk Indicators for Increased Probing Depth in an Isolated Population in Brazil. *J Periodontol*. 2008;79(9):1726-34.

Cropsey KL, Eldridge GD, Weaver MF, Villalobos GC, Stitzer ML. Expired carbon monoxide levels in self-reported smokers and nonsmokers in prison. *Nicotine Tob Res*. 2006 Oct;8(5):653-9.

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;27:417-24.

Delima SL, McBride RK, Preshaw, PM, Heasman PA, Kumar PS. Response of subgingival bacteria to smoking cessation. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2344-9.

Eggert FM, McLeod MH, Flowerdew G. Effects of smoking and treatment status on periodontal bacteria: evidence that smoking influences control of periodontal bacteria at the mucosal surface of the gingival crevice. *J Periodontol*. 2001;72:1210-20.

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

Fullmer S.C., Preshaw PM, Heasman PA, Kumar PS. Smoking cessation alters subgingival microbial recolonization. *J Dent Res* 2009;88:524-8.

Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, et al. 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.

Gomes SC, Nonnenmacher C, Susin C, Oppermann RV, Mutters R, Marcantonio RA. The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2008 Dec;79(12):2297-304.

Güntsche A, Erler M, Preshaw PM, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. *J Periodont Res*. 2006;41:184-8.

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol*. 2004;31(11):996-1002.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2001;28:377-88.

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.

Heikkinen AM, Pitkaniemi J, Kari K, Pajukanta R, Elonheimo O, Koskenvuo M, et al. Effect of teenage smoking on the prevalence of periodontal bacteria. *Clin Oral Invest*. 2012;16:571-80.

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.

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;32:778-83.

Johnson GK, Guthmiller JM. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontol 2000*. 2007;44:178-94.

Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early on set periodontitis. *J Periodontal Res*. 1999;34:25-33.

Figure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodontal Res*. 1995;30:332-41.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-

time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.

Kumar PS, Matthews CR, Joshi V, de Jager M, Aspiras M. Tobacco smoking affects bacterial acquisition and colonization in oral biofilms. *Infect Immun.* 2011;79(11):4730-8.

Kubota M, Tanno-Nakanishi M, Yamada S, Okuda K, Ishihara K. Effect of smoking on subgingival microflora of patients with periodontitis in Japan. *BMC Oral Health.* 2011;11(1): doi: 10.1186/1472-6831-11-1.

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

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.

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

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

MacLaren DJ, Conigrave KM, Robertson JA, Ivers RG, Eades S, Clough AR. Using breath carbon monoxide to validate self-reported tobacco smoking in remote Australian Indigenous communities. *Popul Health Metr.* 2010 Feb 20;8(1):2.

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;26(4):308-13.

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;31(12):1054-60.

Noiri Y, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T, Ebisu S. An immunohistochemical study on the

localization of *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* and *Actinomyces viscosus* in human periodontal pockets. *J Periodontol Res.* 1997; 32: 598-607.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. *J Clin Periodontol.* 2005;32:180–95.

Preber H, Bergström J, Linder LE. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol.* 1992 Oct;19(9 Pt 1):667-71.

Renvert S, Wikström M, Helmersson M, Dahlén G, Claffey N. Comparative study of subgingival microbiological sampling techniques. *J Periodontol.* 1992 Oct;63(10):797-801.

Salvi GE, Ramseier CA, Kandylaki M, Sigrist L, Awedowa E, Lang NP. Experimental gingivitis in cigarette smokers: A clinical and microbiological study. *J Clin Periodontol* 2005;32:441-7.

Scott DA, Palmer RM, Stapleton JA. Validation of smoking status in clinical research into inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001 Aug;28(8):715-22.

Shchipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *J Den Res.* 2010;89(11):1247-53.

Shiloah J, Patters MR, Waring MB. The Prevalence of pathogenic periodontal microflora in healthy young adult smokers . *J Periodontol.* 2000;71:562-7.

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

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. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002;28:12-55.

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

Spiekerman CF, Hujoel PP, DeRouen TA. Bias induced by self-reported smoking on periodontitis-systemic disease associations. *J Dent Res*. 2003 May;82(5):345-9.

Stoltenberg JL, Osborn JB, Pihlstrom BL, Herzberg MC, Aepli DM, Wolff LF, Fischer GE. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol*. 1993 Dec;64(12):1225-30.

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

Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MR, Mayer MP. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009 Jun;36(6):482-7.

Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable Periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol* 2000;71:743-51.

Tonetti MS, Claffey N. European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:210-3.

van Winkelhoff AJ, Bosch-Tijhof CJ, Winkel EG, van der Reijden WA. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol*. 2001;72(5):666-71.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000;27(10):722-32.

Zambon JJ, Grossi SG, Matchtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol*. 1996;67:1050-4.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



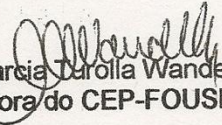
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 362153
Protocolo 157/2010

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o Projeto de pesquisa "Efeito do abandono do hábito de fumar na microbiota periodontal de fumantes", de responsabilidade dos Pesquisadores Mariana Rocha Guglielmetti, Rafael de Tarso, Barbosa Moreira e Prof. Dr. Giorgio de Micheli sob orientação do(as) Prof.(a.) Dr.(a.) Claudio Mendes Pannuti.

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 a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 23 de setembro de 2010.


 Profa. Dra. Marcia Durólla Wanderley
 Coordenadora do CEP-FOUSP


 Maria Cecília Forte Muniz
 Secretária
 Nº USP 2115436 - DRT 42701/SP