MARIANA DE SOUSA RABELO

**Efeito da terapia periodontal supragengival em parâmetros microbiológicos de
pacientes portadores de diabetes do tipo 2**

São Paulo
2013

MARIANA DE SOUSA RABELO

**Efeito da terapia periodontal supragengival em parâmetros microbiológicos de
pacientes portadores de diabetes do tipo 2**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito

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

Rabelo, Mariana de Sousa.

Efeito da terapia periodontal supragengival em parâmetros microbiológicos de pacientes portadores de diabetes do tipo 2 / Mariana de Sousa Rabelo; orientador Giuseppe Alexandre Romito. -- São Paulo, 2013.

67 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 corrigida.

1. Diabetes Mellitus não insulino-dependente. 2. Periodontite crônica. 3. Tratamento periodontal. I. Romito, Giuseppe Alexandre. II. Título.

Rabelo MS. Efeito da terapia periodontal supragengival em parâmetros microbiológicos de pacientes portadores de diabetes do tipo 2. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: 03 / 02 /2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito Instituição: FOU SP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Marina Helena Cury Gallotini Instituição: FOU SP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Poliana Mendes Duarte Instituição: Universidade Guarulhos

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Olga e Francisco**.

À minha mãe **Olga**, que sempre exerceu de maneira tão apaixonada a maternidade. E como é difícil essa tarefa de educar um filho. Como sofremos com a mudança para São Paulo em 2006, mas mesmo diante das dificuldades você me apoiou e acreditou no meu potencial. O carinho e a orientação nunca foram menores do que quando a distância e o tempo eram mais favoráveis. Saiba que eu te admiro muito, Mãe.

Ao meu pai **Francisco**, meu maior exemplo de dedicação à vida acadêmica, grande ser humano, mestre e amigo. Obrigada por me apoiar sempre, por me incentivar a seguir meu caminho mesmo que isso represente, de alguma maneira, um afastamento circunstancial. A sua participação na minha trajetória é inestimável! Espero ser sempre motivo de orgulho. Se estou aqui hoje, foi porque você e minha Mãe foram sempre grandes professores.

À minha irmã **Yana**, que é um grande exemplo de dedicação e que exerce o papel de irmã mais velha com tanto carinho e generosidade. Muito obrigada pelo amor, cuidados e por tirar todas as minhas dúvidas da área médica com tanta paciência.

Ao **Leonardo**, presença carinhosa e constante no dia a dia de São Paulo. Você sabe como seu apoio e afeto, desde os primeiros tempos nesta cidade até hoje, foram imprescindíveis! Essa conquista é sua também!

Ao meu querido cunhado **Thiago** por todo o apoio e amizade. Você é um ser humano maravilhoso. Fico muito feliz de tê-lo na minha família.

Às minhas amigas e irmãs por escolha, **Daniela** e **Larissa**. A nossa amizade e cumplicidade representam desde a infância um apoio muito importante. Obrigada por me escutarem sempre e por acreditarem tanto no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Titular Giuseppe Alexandre Romito**, por ter acreditado na aluna ainda de graduação que o procurou em 2009. Obrigada por investir no meu potencial e por confiar em mim. Obrigada também pelas oportunidades, preocupação e pela orientação. Serei sempre grata por ter me recebido como sua orientanda e pelo grande amadurecimento que isso tem representado na minha trajetória profissional.

À **Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer**, por me aceitar no seu laboratório e por estar sempre pronta para esclarecer as dúvidas durante a análise laboratorial desta tese.

À **Profa. Dra. Priscila Larcher Longo**, pela grande orientação no ambiente de laboratório, por toda a paciência e disposição em me ajudar. Esse processo todo resultou em algo ainda mais valioso que é a sua amizade.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Atala Dib** por abrir as portas do Centro de atendimento a pacientes diabéticos do Hospital São Paulo, UNIFESP, para que o grupo diabetes pudesse realizar não só esse trabalho, mas todos os outros que ainda estão por vir.

Ao **Prof. Dr. Cesário Antônio Duarte**, por tudo o que me ensinou e por abrir as portas de seu consultório ainda durante a minha graduação.

À **Profa. Dra. Luciana Saraiva de Campos**, pelas trocas de experiência no laboratório e por toda a disposição em me ajudar.

À **Profa. Dra. Marina Clemente Conde**, por acreditar no meu potencial e por me ajudar a descobrir a importância da periodontia. Ser sua aluna de clínica foi, sem dúvida nenhuma, parte decisiva na minha escolha.

Ao **Prof. Dr. João Batista César Neto**, pela amizade e pela disposição em me ensinar. Obrigada pelas oportunidades que sempre me ofereceu para que eu pudesse aprofundar mais os meus conhecimentos

Ao **Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti**, pelos ensinamentos durante a graduação, monitoria e estágio PAE.

Ao **Prof. Dr. Francisco Emilio Pustiglioni**, por tudo o que nos ensinou durante os seminários. Obrigada, sua experiência e ensinamentos contribuíram muito para meu aprendizado.

À **Profa. Dra. Marinella Holzhausen**, pela amizade, pelo carinho e prontidão em ajudar e ensinar.

Ao **Prof. Dr. Giorgio De Micheli**, por toda a amizade e ensinamento nesses anos de pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Luiz A.P.A. Lima**, pelos ensinamentos durante os seminários.

Ao **Prof. Dr. Christiano Susin**, pela amizade e atenção durante o mês que passei na *Georgia Regent University* e pelos ensinamentos de grande valia, aplicados inclusive no desfecho final desta dissertação. Tenho certeza que essa parceria será um passo muito importante para a minha formação acadêmica.

À **Adriana Moura Foz**, por tudo que me ensinou ao longo desses quatro anos e, principalmente, pelo carinho e atenção de irmã para comigo nos momentos difíceis. Você foi um grande apoio e me mostrou que eu ganhei não só uma amiga, mas uma “sister paulistana”. Obrigada por tudo, sempre.

À **Hilana Paula Carillo Artese**, por compartilhar comigo o processo de aprendizado ao longo desses quatro anos. Sem dúvida nenhuma, você tornou esse processo muito mais tranquilo, divertido e enriqueceu enormemente meu aprendizado. Serei sempre grata.

Aos meus amigos e companheiros do projeto Diabetes, **Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana e Giovane Hisse Gomes**, é muito bom trabalhar com vocês. Obrigada pelo carinho e por dividirem sempre com muita generosidade todo o conhecimento e experiência de vocês.

Às queridas amigas **Isabela Alonso Tomazelli, Luana Lopes e Daniele Albuquerque** que nos ajudam no projeto diabetes. Sem vocês, a realização do projeto seria muito mais difícil. É muito bom trabalhar e estar com vocês.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia da Profa. Marcia Mayer (ICB USP), por todo o respeito e ajuda.

Aos meus colegas de pós-graduação: **Mariana Rocha, Marcelo Sirolli, Priscila Vivas, Michele Rodrigues, Henrique Bueno e Carlos Eduardo Mafra**. Obrigada pela amizade, companheirismo e por toda ajuda. Um agradecimento especial para a **Mariana Rocha** pela parceria nos seminários, pelo carinho e por dividir comigo a sua experiência.

Às minhas queridas amigas dos tempos de faculdade: **Talita Holanda, Valéria Ribeiro, Cláudia Piedade, Andréa Queiroz, Heloisa Viana e Graziella de Paula**. A amizade de vocês foi um presente aqui em São Paulo.

Aos meus amigos e amigas que acompanharam a minha caminhada e, mesmo de longe, sempre me apoiaram nessa jornada e a correr atrás dos meus sonhos e objetivos. Um agradecimento especial para: **Ana Bárbara Canedo Oliveira, Daniela Martins Araújo, Larissa Vasconcelos, Lara Daher Rassi e Murillo Bonfim Santos**.

Aos meus primeiros “alunos” de clínica que me fizeram ter ainda mais vontade de continuar trilhando um caminho na vida acadêmica.

À secretária e à técnica da Disciplina de Periodontia: **Marcia Maria dos Santos e Marília Camargo Gomes** por toda a ajuda e amizade.

Aos **Professores da Banca Examinadora**, agradeço por terem aceitado o convite e por enriquecerem esse trabalho com suas sugestões e críticas.

À **FAPESP**, pelo Auxílio à Pesquisa (protocolo nº2011/06982-4).

À **CAPES**, pela bolsa de mestrado no Programa de Demanda Social.

RESUMO

Rabelo MS. Efeito da terapia periodontal supragengival em parâmetros microbiológicos de pacientes portadores de diabetes do tipo 2. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2013. Versão Corrigida.

Objetivos: Avaliar o impacto da terapia periodontal supragengival nos parâmetros clínicos e microbiológicos de pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) em um período de 6 meses, através da utilização do PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. **Material e Métodos:** A amostra foi composta por 20 pacientes portadores de DMT2. Os indivíduos foram randomizados em dois grupos diferentes e receberam duas formas de tratamento periodontal. O grupo teste, composto por 10 indivíduos, recebeu terapia periodontal supragengival (TPS) e o grupo controle, também com 10 indivíduos, recebeu terapia periodontal intensiva (TPI), considerada como o padrão ouro. Ambos os grupos receberam orientação de higiene (OHB), durante os 6 meses da realização do estudo. Foram coletadas amostras de biofilme subgengival em um sítio raso e outro profundo, antes do tratamento periodontal e após seis meses do seu término, perfazendo um total de 4 amostras por paciente. Foram avaliadas quatro bactérias periodontais (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) e também foi feita a contagem Universal das bactérias presentes. O estudo avaliou um total de 80 amostras. Foram também coletados os dados clínicos periodontais. A quantidade de bactérias pré e pós tratamento foi determinada pela técnica de PCR em tempo real. Os dados clínicos e microbiológicos foram analisados por métodos estatísticos não-paramétricos. **Resultados:** A análise dos dados demográficos e clínicos no baseline, mostrou não haver diferenças entre os grupos TPS e TPI. Existem diferenças significativas entre os tratamentos com relação à melhora do sangramento ($p<0,001$) e profundidade clínica de sondagem (PCS) ($p=0,011$), em ambos à melhora pelo tratamento TPI é maior. Quanto a melhora dos parâmetros clínicos periodontais em cada um dos grupos após 6 meses, apenas a supuração não melhorou para o grupo TPS. Os demais parâmetros clínicos melhoram significativamente em ambos os tratamentos.

Com relação aos dados microbiológicos, nas bolsas rasas os grupos são diferentes para a medida de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* na avaliação de 6 meses. No entanto, quando comparamos as diferenças (log final- log inicial), não houve diminuição significativa entre os grupos para nenhuma das bactérias. Com relação à diminuição do número de bactérias em cada um dos tratamentos, houve uma diminuição significativa para *T. forsythia* no grupo TPI. Nas bolsas profundas, quando comparamos as diferenças (log final- log inicial), não houve diminuição significativa entre os grupos para nenhuma das bactérias avaliadas, bem como após 6 meses em cada um dos tratamentos. Quando fazemos a razão do número de cópias de cada bactéria com relação ao número de cópias total (Universal) nas bolsas rasas, existe diferença significativa entre os grupos para *P. gingivalis* ($p=0,043$) e *A. actinomycetemcomitans* ($p=0,019$) na avaliação de 6 meses. Com relação à diminuição das proporções para cada um dos tratamentos após 6 meses, TPI foi capaz de reduzir significativamente o número de *T. forsythia* nas bolsas rasas ($p=0,004$) e o número de *P. gingivalis* nas bolsas profundas ($p=0,037$).

Palavras-chave: Diabetes Mellitus tipo 2. Periodontite crônica. Tratamento Periodontal. Microbiologia.

ABSTRACT

Rabelo, MS. Effect of supragingival periodontal therapy on microbiological parameters in patients with type 2 diabetes [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

Objectives: To evaluate the supragingival periodontal therapy in clinical and microbiological parameters in subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM) in a 6 month period by using real-time PCR. **Material and Methods:** The study included 20 individuals with T2DM. The subjects were divided into two groups and received two different forms of periodontal treatment. A group of 10 individuals received supragingival periodontal treatment (SPT) and another, also with 10 patients received intensive periodontal treatment (IPT), the gold standard. Samples were collected from subgingival biofilm in shallow sites and deep sites before and after six months of the periodontal treatment, a total of four samples per patient. We evaluated four periodontal pathogens (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*) and was also made Universal count of bacteria present. The study evaluated a total of 80 samples. Clinical parameters were also accessed. The amount of bacteria before and after treatment was determined by real time PCR. Clinical and microbiological data were analyzed by non-parametric statistical methods. **Results:** The analysis of demographic and clinical data at baseline, showed no differences between groups SPT and IPT. There are significant differences between the treatments with regard to improvement of bleeding ($p<0.001$) and probing depth (PD) ($p=0.011$) in both the IPT improvement is greater. Regarding the improvement of clinical periodontal parameters after 6 months for each group, only the suppuration has not improved for the SPT group. The other clinical parameters improved significantly in both treatments. Regarding the microbiological data in the shallow sites, the groups are different for the measurement of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in the evaluation of 6 months. However, when comparing the differences (end log – inicial log), there was no significant decrease between groups for any of the bacteria. With respect to reducing the number of bacteria in each of the treatments, there was a

significant decrease in *T. forsythia* for IPT. In the deep sites, the groups are different for the measurement of *A. actinomycetemcomitans* at baseline. However, when comparing the differences (end log – initial log), there was no significant decrease between groups for any of the bacteria evaluated. There was also no significant decrease in the number of bacteria after 6 months in each treatment. When we make the ratio of the number of copies of each bacteria with respect to the number of complete copies (Universal) in shallow sites, there is a significant difference between groups for *P. gingivalis* ($p=0.043$) and *A. actinomycetemcomitans* ($p = 0.019$) in the evaluation of 6 months. With regard to reduction for each treatment after 6 months, IPT was able to significantly reduce the number of *T. forsythia* in shallow sites ($p = 0.004$) and the number of *P. gingivalis* in deep sites ($p= 0.037$).

Keywords: Diabetes mellitus type 2. Chronic periodontitis. Periodontal Treatment. Microbiology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Sequências e referências dos primers utilizados para as análises das diferentes amostras bacterianas	32
Tabela 4.2 - Ciclos utilizados para reação de PCR em tempo real por espécie bacteriana analisada.	32
Tabela 5.1 - Dados demográficos dos grupos TPI e TPS no baseline.....	37
Tabela 5.2 - Comparação das medianas e quartis (25-75%) dos parâmetros clínicos dos grupos TPS e TPI antes e após tratamento periodontal.....	38
Tabela 5.3 - Comparação entre os log10 do número de cópias do gene 16S rRNA (das bactérias avaliadas (Bolsas rasas))......	40
Tabela 5.4 - Comparação entre os log10 do número de cópias do gene 16S rRNA das bactérias avaliadas (Bolsas profundas).....	41
Tabela 5.5 - Comparação entre as proporções do número de cópias do gene 16S rRNA das bactérias avaliadas com relação ao número obtido de bactérias totais pela utilização do primer universal (Bolsas rasas)	42
Tabela 5.6 - Comparação entre as proporções do número de cópias do gene 16S rRNA das bactérias avaliadas com relação ao universal (Bolsas profundas).	43

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Aa</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AAP	Academia americana de periodontia
ADA	American diabetes association
AGE	Produto final de glicação avançada
CA	Califórnia
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CI	Consulta inicial
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dL	Decilitros
DM	Diabetes Mellitus
DMT2/T2DM	Diabetes Mellitus tipo 2/ Type 2 Diabetes Mellitus
DNA	Ácido deoxi ribonucleico
DP	Doença Periodontal
EUA	Estados Unidos da América
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HAS	Hipertensão arterial
HbA1c	Hemoglobina glicada
HIV	Human immunodeficiency virus
IP/PI	Índice de placa / plaque index
IG/GI	Índice gengival / gingival index
IMC	Índice de massa corpórea
LB	Luria Bertani
log	Logarítmo
MA	Massachusetts
m	Meses
min	Minutos
mm	Milímetros
n	Número de pacientes
NCI/CAL	Nível clínico de inserção / clinical attachment level
OHb	Orientação de higiene bucal
OMS	Organização Mundial da Saúde

p	nível de significância
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCS/PD	Profundidade clínica de sondagem / probing depth
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RAR	Raspagem e alisamento radicular
rRNA	RNA ribossomal
R1	Reavaliação após 2 meses do término do TP
R2	Reavaliação após 4 meses do término do TP
R3	Reavaliação após 6 meses do término do TP
S	Consulta para seleção de pacientes
SOC	Meio de cultura
seg	Segundos
SS/BOP	Sangramento à sondagem / bleeding on probing
SUP	Supuração
T	Tempo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
<i>Td</i>	<i>Treponema denticola</i>
TE	Tampão biológico
<i>Tf</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TP	Tratamento periodontal
TPI/IPT	Terapia intensiva/ intensive periodontal therapy
TPS/SPT	Terapia supragengival/ supragingival periodontal therapy
UNC	University of North Carolina
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
UK	United Kingdom
WI	Wisconsin
µg	Micrograma
µl	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
°C	Graus Celcius
x	Vezez
®	Registred trademark
™	Trademark

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Seleção da Amostra	26
4.2 Critérios de Inclusão	27
4.3 Critérios de Exclusão.....	28
4.4 Exame Clínico Intrabucal.....	28
4.5 Coleta de Biofilme subgengival	29
4.6 Coleta de Sangue Periférico.....	30
4.7 Tratamento Periodontal	30
4.8 Preparação das Amostras para a Análise Laboratorial.....	31
4.9 PCR em tempo real	31
4.9.1 Controles das reações	33
4.10 Análise Estatística.....	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Resultados Clínicos	37
5.2 Resultados microbiológicos	39
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICE	59
ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos microbiológicos do tratamento periodontal convencional (raspagem e alisamento corono radicular, sub e supra gengival) já foram demonstrados em diversos estudos (Pedrazolli et al., 1991; Ali et al., 1992; Haffajee et al., 1997; Colombo et al., 2005), nos quais foram observadas diminuições consideráveis nas quantidades de periodontopatógenos subgengivais. Já foi demonstrado que o controle de biofilme supragengival também parece influenciar de forma benéfica os resultados da terapia convencional (Feres et al., 2009), tanto para os parâmetros clínicos, como para parâmetros microbiológicos. O papel deste controle no cenário de manutenção dos resultados do tratamento parece estar relacionado à capacidade que o biofilme supragengival tem em modular o biofilme subgengival (Ximénez-Fyvie et al., 2000).

A ideia de introduzir um rigoroso controle de placa profissional como parte da fase ativa da terapia periodontal foi descrita pela primeira vez na década de 70 (Rosling et al., 1976). Alguns grupos de investigadores sugeriram que a remoção do biofilme supragengival, durante períodos prolongados de tempo, traria um benefício para os resultados clínicos e microbiológicos da terapia periodontal (Rosling et al., 1976; Lindhe et al., 1982; Westfelt et al., 1983; Magnusson et al., 1984). Sendo assim, o controle de biofilme supragengival tem sido considerado uma condição de fundamental importância para o estabelecimento da saúde periodontal (Axelsson et al., 2004).

A terapia supragengival, na qual a raspagem supragengival é realizada concomitante ao controle da higiene bucal, também parece influenciar positivamente parâmetros clínicos e microbiológicos em pacientes com doença periodontal crônica (McNabb et al., 1992; Hellstrom et al., 1996).

Tradicionalmente, a avaliação dos efeitos benéficos da terapia periodontal mecânica na microbiota subgengival é realizada após o controle mecânico simultâneo do biofilme supra e subgengival (Ximenez-Fyvie et al., 2000; Doungudomdacha et al., 2001; Apatzidou et al., 2005). No entanto, resultados contraditórios têm sido relatados quando o único tratamento realizado foi o supragengival (Kho et al., 1985; McNabb et al., 1992; Hellstrom et al., 1996; Nogueira Moreira et al., 2000). Rossi et al. (2012) sugeriram que para uma melhor avaliação

do impacto do controle supragengival, novos estudos que se preocupem em distinguir a reposta supragengival de forma independente da resposta subgengival devem ser realizados.

Tanto a Diabetes Mellitus (DM) quanto a periodontite crônica são doenças que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos (American Diabetes Association, 2013). A presença de diabetes parece predispor a doenças infecciosas e afetar negativamente os resultados do tratamento. Vários estudos sugerem que a resposta imune alterada pela DM poderia explicar o maior risco às infecções (Joshi et al., 1999; Muller et al., 2005).

Sendo assim, parece ser a resposta do hospedeiro à bactéria que leva primariamente a uma maior severidade da doença periodontal em pacientes diabéticos, uma vez que estudos em humanos e animais mostraram uma resposta neutrofílica deficiente nesses pacientes (Manouchehr- Pour et al., 1981; Golub et al., 1982). Já foi mostrado que a diabetes causa uma redução na formação óssea e aumenta a apoptose de células osteoblásticas, o que acaba por estimular a perda óssea (He et al., 2004).

Diante do que foi colocado, pode-se questionar se o controle supragengival em pacientes diabéticos poderia influenciar a composição do biofilme subgengival, como é esperado em pacientes sistemicamente saudáveis (McNabb et al., 1992; Hellstrom et al., 1996). Isto porque, com o prejuízo da defesa imune local e da renovação dos tecidos periodontais devido à diabetes, poderia não ocorrer tantas alterações no ambiente subgengival.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A Diabetes Mellitus (DM) e a periodontite afetam milhões de pessoas em todo o mundo. A DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina, ou ambos (American Diabetes Association, 2013). A prevalência de DM é de aproximadamente 7%, correspondente a 347 milhões de indivíduos, sendo que a projeção é de que ela se torne a sétima principal causa de morte em 2030 (World Health Organization, 2013). No Brasil esse número passa de 5,2% da população geral (Brasil, 2012). A diabetes tipo 2 (DMT2) representa cerca de 90% das pessoas com diabetes em todo o mundo (World Health Organization, 2013). Muitos fatores contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de DM, como a genética, dieta, estilo de vida e obesidade. As cinco complicações clássicas da doença como retinopatia, neuropatia, nefropatia, complicações cardiovasculares e alterações na cicatrização de feridas estão associadas à alteração do metabolismo da glicose que produz alterações nas circulações macro e micro-vasculares (Baynes et al., 1984).

A periodontite é uma doença inflamatória crônica multifatorial desencadeada por bactérias patogênicas que fazem parte do biofilme bacteriano e interagem com os tecidos e células do hospedeiro (Bosshardt; Lang, 2005). Se o indivíduo for susceptível, tais patógenos se propagam nos tecidos periodontais, liberam seus antígenos e promovem alteração na integridade dos mesmos, levando à destruição dos tecidos periodontais e osso alveolar (Lang et al., 2005). A estimativa global da prevalência da doença periodontal severa é de 10 a 15% da população, sendo que 90% podem ser afetados por alguma forma de doença periodontal mais leve, incluindo a gengivite (Pihlstrom et al., 2005).

A DM é considerada como um importante fator de risco para a doença periodontal (Soskolne; Klinger, 2001), sendo indicada como a sexta complicação do diabetes, baseado na alta frequência da presença de ambas as doenças no mesmo paciente (Løe, 1993; Grossi; Genco, 1998; Mealey; Oates, 2006). Nos pacientes diabéticos, a doença periodontal se apresenta em forma mais severa e evolui mais rapidamente do que no paciente sistemicamente saudável (Papapanou, 1996). Esse fator está ligado ao prejuízo na resposta imune local (Mealey; Oates, 2006).

São encontrados no periodonto dos pacientes diabéticos, maiores níveis de produtos finais de glicação avançada (AGEs), um grupo de moléculas formadas por uma reação não enzimática de redução dos açúcares e de outros carboidratos (Fu et al., 1996; Vlassara; Palace, 2002). A interação entre AGEs e o colágeno gera macromoléculas de colágeno altamente instáveis, que são resistentes à degradação enzimática fisiológica (Monnier et al., 1996). Por isso, a renovação de todo o tecido periodontal é efetivamente comprometida em indivíduos diabéticos, especialmente quando o controle glicêmico é deficiente.

Vários estudos investigaram a composição do biofilme dental em diabéticos (Mashimo et al., 1983; Mandell et al., 1992; Sbordone et al., 1995; Ebersole et al., 2008). Uma alta prevalência dos chamados patógenos periodontais foi encontrada em pacientes diabéticos (Mashimo et al., 1983; Mandell et al., 1992). Entretanto, diferenças específicas da microbiota da doença periodontal de pacientes diabéticos e não diabéticos não são claras (Ebersole et al., 2008). Investigações microbiológicas revelaram que a microbiota bacteriana em sítios doentes periodontalmente é semelhante em indivíduos diabéticos e saudáveis sistemicamente (Sbordone et al., 1995; Campus et al., 2005; Ebersole et al., 2008). Sbordone et al. (1995) relataram microbiota semelhante em indivíduos com e sem diabetes tipo 2, onde a prevalência da *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) foi semelhante para ambos os grupos. Uma maior prevalência de *P. gingivalis* foi demonstrada em indivíduos diabéticos tipo 2 em comparação a não diabéticos, através de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Campus et al., 2005). Ebersole et al. (2008) mostraram aumento significativo na frequência de *P. gingivalis*, *Campylobacter spp.* e *A. actinomycetemcomitans* na placa subgengival de diabéticos em comparação com os não-diabéticos.

Também já foi mostrado que o controle de biofilme supragengival parece influenciar de forma benéfica os resultados da terapia convencional (Feres et al., 2009), tanto para os parâmetros clínicos, como para parâmetros microbiológicos. Alguns estudos sugeriram que vários patógenos periodontais podem colonizar o biofilme supragengival em altos níveis e proporções e isto poderia contribuir para a recolonização subgengival de sítios recentemente tratados por estas espécies (Ximénez-Fyvie et al., 2000; Shibli et al., 2007; Haffajee et al., 2008).

Dentro do contexto apresentado, o tratamento supragengival no qual a

raspagem supragengival é realizada concomitante ao controle da higiene bucal também parece influenciar positivamente parâmetros clínicos e microbiológicos em pacientes com doença periodontal crônica (Dahlén et al., 1992; McNabb et al., 1992; Hellstrom et al., 1996). McNabb et al. (1992) examinaram seis indivíduos com higiene bucal deficiente, gengivite severa e sítios com profundidade clínica de sondagem (PCS) entre 4 a 5 mm durante 24 semanas. Um regime de tratamento de controle de biofilme supragengival, que consistia em profilaxia profissional 3 vezes por semana, foi realizado nesse período experimental. Avaliações clínicas e microbiológicas por meio de cultura e microscopia de campo escuro foram realizadas a cada 3 semanas. Melhoras clínicas e microbiológicas, com relação à redução de *P. gingivalis* e espiroquetas em sítios moderados (4 a 5 mm) foram observadas. Resultados similares foram observados por Dahlén et al. (1992), que realizaram uma supervisão meticulosa da remoção da placa supragengival por meio de instrução de higiene bucal. Após a reavaliação, os autores relataram alterações benéficas na composição do biofilme subgengival em sítios com PCS > 4mm em um período de 2 anos.

Hellstrom et al. (1996) selecionaram 12 voluntários que possuíam 6 a 8 sítios periodontais com PCS > 5mm e, ao menos, um sítio com defeito supra-ósseo, um sítio com defeito infra-ósseo e um sítio com envolvimento de bifurcação. Os sítios selecionados foram mensurados clinicamente quanto à presença de biofilme, gengivite, PCS e perda de nível clínico de inserção (NCI) e microbiologicamente, por meio de cultura, para análise da contagem total das unidades formadoras de colônias e quanto à presença de *P. gingivalis*. Após essas mensurações, os indivíduos receberam raspagem supragengival e foram orientados a manter uma boa higiene bucal. Durante as 30 semanas subsequentes, os voluntários receberam profilaxia profissional 2-3 vezes por semana e após este período um novo exame foi realizado. Os achados indicaram que o repetido controle de biofilme profissional combinado com a higiene oral feita pelo paciente reduziu a contagem total de bactérias e a prevalência de *P. gingivalis* em bolsas moderadas e profundas, independentemente da característica do sítio tratado.

Em contraste com esses resultados, alguns trabalhos não mostraram alterações significativas no biofilme subgengival após raspagem supragengival. Kho et al. (1985) selecionaram 8 pacientes com doença periodontal crônica e mantiveram esses indivíduos em um programa de controle de biofilme supragengival (1 visita

semanal durante 3 semanas consecutivas, no qual instruções de higiene bucal e profilaxia profissional eram realizadas). Foi selecionado um sítio profundo (PCS > 6mm) de cada indivíduo para análise por cultura, no início do estudo e 8 e 16 semanas após a última profilaxia. Não houve nenhuma diferença significativa em nenhum dos períodos de avaliação. A conclusão dos autores foi que o controle de biofilme supragengival não foi capaz de alterar significativamente a composição do biofilme subgengival (11 espécies de bactéria avaliadas), nos sítios selecionados. Beltrami et al. (1987) realizaram apenas o controle profissional do biofilme supragengival em indivíduos com periodontite crônica. Oito indivíduos foram selecionados e divididos em 2 grupos, seguindo o modelo experimental de boca dividida: sítios teste, que receberam profilaxia supragengival 3 vezes por semana por um período de 3 semanas, e sítios controle, que receberam apenas a orientação de higiene bucal. Dois pares de sítios contralaterais com PCS > 6,5 mm de cada voluntário foram selecionados para análise de microscopia de campo escuro. Os índices de placa diminuíram nos sítios experimentais quando estes foram comparados aos sítios controle. Nenhuma variação foi observada no índice gengival, na profundidade de sondagem e na composição da placa subgengival entre os sítios teste e controle. Loos et al. (1988) selecionaram 15 indivíduos que, após uma avaliação inicial, foram orientados e motivados com relação ao controle de biofilme supragengival. Os voluntários retornavam 6 semanas após o exame para nova motivação. Foram observadas melhoras no padrão de higiene bucal e na condição gengival; entretanto, nenhuma alteração microbiológica no ambiente subgengival, utilizando o método de cultura, foi observada 12 semanas após a consulta inicial.

Em um estudo com fumantes e não fumantes, tendo o controle do biofilme supragengival como intervenção única, mostrou uma redução significativa de bactérias totais e selecionadas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *D. pneumosintes*, e *P. micra*), independente da categoria e da PCS inicial (Gomes et al., 2008). Outro estudo também em fumantes e não fumantes mostrou melhoras clínicas consideráveis para ambos os grupos, após 21 dias da raspagem supragengival. Com relação ao desfecho microbiológico, o grupo dos fumantes mostrou uma menor resposta ao tratamento supragengival (Meulman et al., 2012).

O efeito do tratamento periodontal em diabéticos também pode ser avaliado pelas alterações ocorridas nos níveis subgengivais de periodontopatógenos. Vários estudos mostraram os efeitos microbiológicos do tratamento periodontal

convencional (raspagem e alisamento corono-radicular, sub e supra gengival) em pacientes sistemicamente saudáveis, nos quais foram observadas diminuições consideráveis de quantidades de periodontopatógenos subgengivais (Pedrazolli et al., 1991; Ali et al., 1992; Colombo et al., 2005). Existem poucos estudos na literatura que avaliaram essas mudanças em pacientes diabéticos. Cruz et al. (2008) realizaram um estudo com 20 indivíduos acometidos por periodontite crônica generalizada, sendo 10 portadores de DM2 e 10 saudáveis. As amostras foram testadas para a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Tannerella forsythia*. Nesse estudo, os autores utilizaram a técnica do PCR convencional para a identificação dos microorganismos e poucas diferenças significativas na diminuição desses periodontopatógenos após 3 meses em ambos os grupos foram notadas. A diferença na diminuição entre diabéticos e não diabéticos também não foi significativa.

Não existem trabalhos na literatura que avaliem a resposta clínica e microbiológica dos pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 ao controle supragengival (raspagem e polimento supragengival), como intervenção única.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivo avaliar se o tratamento supragengival pode melhorar parâmetros microbiológicos e parâmetros clínicos periodontais em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 com periodontite crônica generalizada, utilizando como controle um grupo diabético submetido ao tratamento convencional (raspagem e alisamento corono-radicular, sub e supra gengival).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo será dividido em subitens para facilitar o entendimento.

4.1 Seleção da Amostra

A população estudada foi de 20 pacientes (sendo um total de 80 amostras), diagnosticados com DMT2, selecionados na Divisão de Endocrinologia do Departamento de Medicina do Hospital da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Sergio Atala Dib. Os pacientes selecionados estavam em acompanhamento médico para controle dos níveis de HbA1c através do uso de medicamentos (agentes hipoglicemiantes, o uso de insulina ou a combinação de agentes hipoglicemiantes + insulina).

Após seleção na UNIFESP, os sujeitos do estudo foram encaminhados para a FOUSP para triagem e tratamento periodontal. A triagem selecionou indivíduos com DMT2 e periodontite crônica generalizada (American Academy of Periodontology, 1999).

Os pacientes, num total de 577, foram triados no período de fevereiro de 2011 a Dezembro de 2012 para que fosse atingida a amostra proposta.

Daquele total, 553 pacientes foram excluídos da pesquisa ainda na fase de anamnese pois não se enquadravam em todos os critérios de inclusão do estudo, por diversos motivos: fumantes, complicações diabéticas como retinopatias, nefropatias, e neuropatias, uso frequente de anti-depressivos, uso de dentaduras inferior e superior, número reduzido de dentes, dificuldade de locomoção, pacientes recém-operados ou com cirurgia agendada e necessidade de uso de antibiótico e anti-inflamatórios por longos períodos. Nesses pacientes o tempo de duração de diabetes variava entre 02 e 30 anos.

Dos 577 pacientes com diabetes nos restaram apenas 24 para o início do tratamento, sendo que 4 foram excluídos no decorrer do estudo por uso de antibióticos, mudança de estado e falta de comparecimento nas consultas agendadas.

Todos os indivíduos da pesquisa foram avaliados, examinados e suas amostras coletadas na Clínica de Pós-Graduação da Disciplina de Periodontia da

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito. Os indivíduos que não se encaixaram nos critérios de inclusão e que necessitavam de atendimento odontológico, foram encaminhados para realização do mesmo.

4.2 Critérios de Inclusão

Todos os pacientes deveriam apresentar pelo menos 35 anos de idade, diagnóstico de DMT2 e no mínimo 15 dentes naturais (excluindo os 3º molares). Foram incluídos indivíduos diagnosticados com periodontite crônica generalizada, de acordo com os critérios clínicos e radiográficos propostos pela Academia Americana de Periodontia (American Academy of Periodontology, 1999).

Os pacientes deveriam apresentar percentuais sanguíneos de hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$ no início do estudo. Foi reportado o uso e o tempo de uso de medicamentos para o controle do diabetes (agentes hipoglicemiantes, o uso de insulina ou a combinação de agentes hipoglicemiantes + insulina). Caso esses pacientes apresentassem múltiplas complicações decorrentes do diabetes (retinopatias, cardiopatias, nefropatias ou neuropatias), seriam excluídos da pesquisa.

A avaliação desses pacientes foi realizada por meio de uma ficha clínica/anamnese. Todos os pacientes aceitaram participar do estudo mediante a assinatura de um termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP/FOUSP: FR-284313, Anexo A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São Paulo (CEP/UNIFESP: 0629/11, Anexo B).

4.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos grávidas e/ou lactantes, pacientes em uso de medicações que afetam a condição periodontal (por exemplo: fenitoína ou ciclosporina), pacientes soropositivos para HIV ou com hepatite (B, C), fumantes, pacientes com doenças sistêmicas não controladas (doenças cardiovasculares como hipertensão, doenças pulmonares ou hepáticas e insuficiência renal), neoplasma, indivíduos que não assinaram o termo de consentimento, aqueles que estavam sob terapia antibiótica crônica ou que tinham feito uso de antibiótico nos últimos 3 meses, uso contínuo de antissépticos orais nos últimos 3 meses, que necessitassem de cobertura antibiótica para procedimentos periodontais e que tivessem sido submetidos a terapia periodontal nos últimos 6 meses da consulta inicial.

4.4 Exame Clínico Intrabucal

O exame clínico periodontal foi realizado por dois operadores calibrados. Para a calibração, um total de 6 pacientes diagnosticados com periodontite crônica moderada, e que não eram elegíveis para o estudo, foram avaliados por dois examinadores. Os examinadores realizaram, no mesmo dia, o exame periodontal completo (PCS, NCI, SS) de cada paciente, em seis sítios por dente. Cada examinador realizou dois exames periodontais por paciente (com um intervalo de 30 minutos entre cada exame), para as avaliações inter e intra examinador. A calibração foi feita através do software SPSS versão 13, através da análise do ICC (coeficiente de correlação intraclasse). A reprodutibilidade inter e intra examinadores se apresentou satisfatória, já que levando em consideração uma variação de 1 mm, os examinadores atingiram uma concordância de 76% para PCS e de 81% para NCI. Os exames clínicos foram feitos utilizando-se a sonda periodontal da Universidade da Carolina do Norte UNC-15 (Hu-Friedy), e incluiu a medição dos parâmetros clínicos descritos a seguir no início, 2, 4 e seis meses após o término da terapia periodontal. Todos os dentes foram avaliados, exceto os terceiros molares,

em seis sítios (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual, disto-lingual), para os seguintes parâmetros na seguinte ordem:

Índice de placa (IP) visível (Ainamo; Bay, 1975)- Presença (1) ou ausência (0) de placa supragengival visível.

Índice gengival (IG) (Ainamo; Bay, 1975)- Presença (1) ou ausência (0) de sangramento à sondagem da margem gengival.

Profundidade clínica de sondagem (PCS) – sondagem em seis sítios por dente. Corresponde, em milímetros, à distância entre margem gengival e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

Nível clínico de inserção (NCI) – distância, em milímetros, entre a junção esmalte-cimento e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal.

Sangramento à sondagem (SS) (Ainamo; Bay, 1975)– presença (positivo) ou ausência (negativo) de sangramento após 20 segundos da sondagem com sonda periodontal milimetrada em cada sítio.

Todos os pacientes realizaram exame radiográfico intrabucal por tomadas periapicais. Essas radiografias foram utilizadas para o diagnóstico, planejamento e tratamento periodontal dos pacientes.

4.5 Coleta de biofilme subgengival

Após a remoção do biofilme supragengival por meio de curetas, a coleta do biofilme subgengival foi feita com cone de papel estéril, em dois sítios, um raso (até 3mm) e outro profundo (>7mm) em hemi-arcos diferentes. As amostras foram depositadas em tubos estéreis que foram identificados e armazenados à -80°C até serem analisados.

4.6 Coleta de Sangue Periférico (HbA1c)

As coletas de sangue periférico foram realizadas por um único enfermeiro e levadas imediatamente após ao laboratório do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (USP) para o seu devido processamento e análise.

As coletas foram realizadas no baseline para a confirmação do diagnóstico desses pacientes.

4.7 Tratamento Periodontal

Os pacientes foram divididos aleatoriamente (n=20) em dois grupos. A randomização foi feita por sequencia gerada através do Excel e o sigilo de alocação garantido através da utilização de envelopes de papel pardo. O grupo do paciente foi revelado apenas ao responsável pelos tratamentos, no dia da realização do procedimento. O grupo teste, foi denominado terapia periodontal supragengival (TPS) e o grupo controle, denominado grupo terapia periodontal intensiva (TPI). Todos os participantes receberam orientação de higiene bucal (OHB). Pacientes que fizeram parte do grupo teste receberam TPS em uma única consulta, usando a combinação de instrumentos manuais e ultrassônicos.

Pacientes que fizeram parte do grupo TPI receberam tratamento periodontal intensivo (raspagem e alisamento radicular-RAR), sob anestesia local. Dependendo da severidade da doença, a RAR foi feita em uma ou duas sessões, em no máximo dois dias. Qualquer dente que, na visita inicial, foi definido como perdido (lesão endo-perio crônica e/ou perda de inserção até ou próximo ao ápice do dente; cárie extensa com impossibilidade de restauração) foi extraído. Após dois meses do término das terapias, foi feita uma reavaliação periodontal, por examinadores cegados para o tipo de tratamento realizado. Também foram feitas reavaliações 4 e 6 meses após o término. Ambos os grupos receberam mensalmente OHB e controle de placa supragengival. O cronograma de procedimentos está descrito na Figura 4.1.

Figura 4.1- Cronograma de procedimentos: S (consulta para seleção de pacientes); CI (consulta inicial); OHB (consulta para orientação de higiene bucal); TP (consulta para tratamento periodontal); R1(reavaliação após 2 meses do término do tratamento periodontal); R2 (reavaliação após 4 meses do término do tratamento periodontal); R3 (reavaliação após 6 meses do término do tratamento periodontal). Intervalo entre T₁eT₅ (28 dias); intervalo entre T₅e T₈ (6 meses). T= tempo; m= meses

4.8 Preparação das Amostras para a Análise Laboratorial

Para extração do DNA bacteriano os cones foram descongelados em gelo, lavados com 200 µl de solução tampão (TE Buffer, 10 mM TrisHCl [pH 7.5], 1 mM EDTA) e agitados por 10 segundos. Foi utilizado o Kit Masterpure DNA purification (Epicentre Biotechnology, Madison, WI, EUA), conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi ressuspenso em tampão TE do próprio kit. Para a verificação da quantidade e qualidade do DNA extraído, foi feita a aferição através de espectrometria, utilizado o NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific,Waltham, MA, EUA). O DNA foi então armazenado em freezer -20°C até sua utilização.

4.9 PCR em tempo real

A análise quantitativa das diferentes bactérias foi realizada por meio de PCR em tempo real utilizando termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) e os produtos detectados por fluorescência usando o sistema SYBR® Green (Applied Biosystems), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para cada reação foi utilizado 10µl de SYBR® Green, 1µl de DNA molde, 8,5µl de água milliQ, 0,5 µl de cada iniciador na concentração de 25pmol/ul (Tabela

4.1), totalizando um volume de 20 µl.

Tabela 4.1- Sequências e referências dos primers utilizados para as análises das diferentes amostras bacterianas

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
<i>P.gingivalis</i>	TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC	Amano et al., 1999
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	ATT GGG GTT TAG CCC TGG T GGC ACA AAC CCA TCT CTG A	Rudney et al., 2003
<i>T. forsythia</i>	GGGTGAGTAACGCGTATGTAACCT ACCCATCCGCAACCAATAAA	Shelburne et al., 2000
<i>T. denticola</i>	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	Ashimoto, et al., 1996.
<i>Universal</i>	CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG GCT TGA CGG GCG GTG T	Ramseier et al., 2009

As reações para 16S *rRNA* foram realizadas seguindo ciclos (Tabela 4.2) específicos para cada bactéria analisada definidos através de diferentes reações de padronização para obtenção dos melhores resultados para a curva padrão e curva de melting.

Tabela 4.2- Ciclos utilizados para reação de PCR em tempo real por espécie bacteriana analisada

Bactéria	Ciclo
<i>P.gingivalis</i>	95° C-10min/95° C-15seg/65° C-1min/83° C-10seg
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	95° C-10min/95° C-15seg/65° C-1min/81° C-10seg
<i>T. forsythia</i>	95° C-10min/95° C-15seg/60° C-1min/74° C-10seg
<i>T. denticola</i>	95° C-10min/95° C-15seg/60° C-1min/82° C-10seg
<i>Universal</i>	95° C-10min/95° C-15seg/60° C-1min

4.9.1 Controles das reações

Em todas as reações foi realizada curva padrão, com quantidades determinadas de *16S rRNA* para comparar com os valores obtidos nas amostras. Foram realizadas diluições seriadas, a partir de 1×10^8 cópias do gene *16S rRNA* específico da espécie a ser analisada inserido em plasmídeos pTOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Os clones de *E. coli* albergando o pTOPO contendo o gene *16S rRNA* específico para *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* faziam parte do acervo do Laboratório de Microbiologia Oral da Profa. Dra. Marcia P.A. Mayer.

Para as bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Treponema denticola* foi realizado o processo de clonagem. Primeiramente fizemos o PCR e posteriormente a adição de dATP. As amostras obtidas foram purificadas através do kit PCR DNA and Gel Band Purification (GE, Buckinghamshire, UK). Os produtos foram quantificados utilizando o NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Foi utilizado o kit TOPO TA Clonig Kit (Invitrogen) que permite a introdução do produto de PCR do gene de interesse num sítio único de inserção pela enzima topoisomerase presente no sistema. A reação de ligação foi realizada utilizando produto de PCR purificado, sal e vetor TOPO. A mistura foi incubada *overnight* a 10°C. Posteriormente foi realizada a eletroporação em células de *E. coli* eletrocompetentes. As células foram incubadas em banho maria por 1 hora em meio SOC. As células foram então semeadas em placas de Petri contendo meio Luria Bertani (LB) sólido e ampicilina na concentração de 50 ug/ml, sensibilizadas com X-gal e deixadas na estufa a 37°C por 18 horas. Após o período de crescimento as colônias brancas foram repicadas para novas placas de LB e deixadas na estufa *overnight*. Após este período, foi escolhido um clone na placa de cultura, e este foi coletado e inoculado em meio líquido para multiplicação e extração de DNA plasmidial.

A extração do DNA plasmidial foi realizada através do Kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Para a verificação da quantidade e qualidade do DNA plasmidial extraído, foi feita a aferição através de espectrometria, utilizando o NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer

(Thermo Scientific). Baseado na medição, foi calculada a concentração de plasmídeo para se obter o plasmídeo a 1×10^8 .

Como controle negativo em cada reação foi adicionada água milliQ estéril ao invés de DNA molde.

Após as reações de amplificação foi realizada a curva de Melting utilizando as seguintes temperaturas: 95°C por 15 segundos, 65°C por 1 minuto e 0,5°C-95°C por 15 segundos (Teixeira et al., 2009). A curva de Melting é essencial para se verificar se houve formação de um único produto ou se produtos inespecíficos também foram formados. Nesse contexto, um único pico sugere a existência de um único produto.

A fluorescência foi detectada após cada ciclo e representada em um gráfico utilizando o software *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). Para garantir a especificidade dos produtos detectados por fluorescência e evitar a detecção de dímeros de iniciadores, a detecção foi realizada um grau abaixo da temperatura de dissociação dos amplicons. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e cada diluição dos plasmídeos para a curva padrão em triplicata.

4.10 Análise Estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o programa SPSS para Windows versão 15.0. Os dados clínicos e microbiológicos foram analisados por métodos estatísticos não-paramétricos.

A fim de verificar se existiu alguma associação entre o tipo de tratamento e as variáveis sócio demográficas qualitativas (etnia, escolaridade, tabaco e renda), foi feito o teste exato de Fisher bicaudal. Para comparar as variáveis sócio demográficas quantitativas (Índice de massa corpórea-IMC-, idade, hemoglobina glicada e tempo de DMT2) foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Na comparação entre duas medianas (intergrupos) foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Na comparação dentro do grupo (intragrupos) antes e após o tratamento periodontal, ou seja acompanhamento do mesmo paciente ao longo do tempo, foi necessário utilizar testes estatísticos pareados. Portanto, para verificar a

redução na mediana (variáveis quantitativas) foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para significância estatística utilizamos $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os grupos TPS e TPI eram compostos de 10 pacientes cada, sendo 09 homens e 11 mulheres. A mediana da idade para os grupos conjuntamente foi de 54,5 anos (TPS: 44 a 77 anos e TPI: 40 a 78 anos). A análise dos dados demográficos e clínicos no baseline, mostrou não haver diferenças entre os grupos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Dados demográficos dos grupos TPI e TPS no baseline

Variável	Categorias	TPS (n=10)	TPI (n = 10)	p valor
Idade, mediana (%25; %75)	-	56 (50,75; 61,75)	52,5 (47,25; 69,5)	0,926
Etnia, freq (%)	Leucoderma	6 (60)	9 (90)	0,303
	Melanoderma	3 (30)	1 (10)	
	Xantoderma	1 (10)	0 (0)	
Escolaridade, freq (%)	Ensino fundamental	2 (20)	3 (30)	0,999
	Ensino médio	8 (80)	7 (70)	
Renda Familiar, freq (%)	1 a 2 salários mínimos	2 (20)	2 (20)	0,999
	3 a 4 salários mínimos	7 (70)	7 (70)	
	5 ou mais	1 (10)	1 (10)	
Insulina, freq (%)	0	8 (80)	6 (60)	0,628
	1	2 (20)	4 (40)	
HAS, freq (%)	Não	3 (30)	4 (40)	0,999
	Sim	7 (70)	6 (60)	
IMC, mediana (%25; %75)	-	25,39 (23,45; 28,96)	28,07 (24,74; 31,31)	0,393
HbA1c, mediana (%25; %75)	-	9,35 (7,77; 10,15)	7,7(6,45; 9,67)	0,212
Tempo de DMT2, mediana (%25; %75)	-	4 (3; 4,75)	5,5 (4; 10)	0,879
IP, proporção boca	-	82,8 (65,1; 95,7)	86,04 (70,6; 97,4)	0,596
SUP, proporção boca	-	0,68 (0; 1,83)	0 (0; 1,2)	0,353
PCS, média boca	-	4,06 (3,1; 4,6)	4,18 (3,7; 4,5)	0,52
NCI, média boca	-	4,66 (3,7; 5,6)	4,89 (4,6; 5,1)	0,999
SS, proporção boca	-	80,94(63; 95,8)	90,6 (85,5; 93,8)	0,623
IG, proporção boca	-	59,3 (53,6; 80,6)	70,45 (44,2; 65,5)	0,739

Teste estatístico Mann-Whitney e Teste exato de Fisher. TPS: Grupo de pacientes submetidos a raspagem supragengival. TPI: Grupo de pacientes submetidos a raspagem e alisamento coronaradicular. PCS: Profundidade clínica de sondagem, NCI: Nível clínico de inserção, SS%: porcentagem de sítios com sangramento à sondagem, IP%: porcentagem de índice de placa, IG%: índice gengival. HAS: hipertensão arterial. IMC: índice de massa corpórea.

5.1 Resultados Clínicos

No baseline, ambos os grupos (TPS e TPI) não apresentaram valores significativamente diferentes para PCS, NCI, SS, IG e IP. Foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos com relação à melhora do sangramento ($p < 0,001$) e PCS ($p = 0,011$); em ambos a melhora pelo tratamento TPI foi maior que no TPS. Quanto à melhora dos parâmetros clínicos periodontais após

6 meses para cada um dos grupos, apenas a supuração não melhorou. Mas, para o grupo TPI a mediana desse parâmetro é zero (baseline e 6 meses). Sendo assim, não houve melhora na supuração para o grupo TPS após 6 meses. Os demais parâmetros clínicos melhoram significativamente em ambos os tratamentos (Tabela 5.2).

Tabela 5.2- Comparação das medianas e quartis (25-75%) dos parâmetros clínicos dos grupos TPS e TPI antes e após tratamento periodontal

		Parâmetros clínicos			p**
		Inicial Mediana (25%; 75%)	6 meses Mediana (25%; 75%)	6 meses - Inicial Mediana (25%; 75%)	
IP, proporção boca	TPS (n=10)	82,8 (65,1; 95,7)	31,31 (8,6; 68)	-39,57 (-55,8; -25)	0,002
	TPI (n=10)	86,04 (70,6; 97,4)	27,83 (22,7; 32,9)	-48,32 (-70; -35)	0,002
	p*	0,596	0,88	0,28	
SS, proporção boca	TPS (n=10)	80,94(63; 95,8)	57,45 (18,5; 64,1)	-36,97 (-40,2; -23,1)	0,002
	TPI (n=10)	90,6 (85,5; 93,8)	17,31 (9,5; 32)	-60,6 (-79; -55,2)	0,002
	p*	0,623	0,063	<0,001	
SUP, proporção boca	TPS (n=10)	0,68 (0; 1,83)	1,07 (0; 1,99)	0,31 (-0,16; 1,5)	0,363
	TPI (n=10)	0 (0; 1,2)	0 (0; 0,95)	0 (0; 0,52)	0,916
	p*	0,353	0,211	0,467	
PCS, média boca	TPS (n=10)	4,06 (3,1; 4,6)	3,12 (2,5; 3,5)	-0,8 (-1;-0,5)	0,002
	TPI (n=10)	4,18 (3,7; 4,5)	2,51 (2,3; 2,9)	-1,42 (-1,7; -1,2)	0,002
	p*	0,52	0,075	0,011	
NCI, média boca	TPS (n=10)	4,66 (3,7; 5,6)	4,22 (3,4; 4,9)	-0,58 (-0,8; -0,47)	0,002
	TPI (n=10)	4,89 (4,6; 5,1)	3,59 (3,4; 4,1)	-1,24 (-1,4; -0,7)	0,002
	p*	0,999	0,481	0,19	
IG, proporção boca	TPS (n=10)	59,3 (53,6; 80,6)	23,44 (3,3; 47)	-40,09 (-50,9; -30,2)	0,004
	TPI (n=10)	70,45 (44,2; 65,5)	14,16 (10,8; 18,1)	-54,97 (-67; -29,6)	0,004
	p*	0,739	0,404	0,28	

**Teste estatístico Wilcoxon. *Teste estatístico Mann-Whitney. Diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. TPS: Grupo de pacientes submetidos a raspagem supragengival e TPI: Grupo de pacientes submetidos a raspagem e alisamento corono-radicular. PCS: Profundidade clínica de sondagem, NCI: Nível clínico de inserção, SS%: porcentagem de sítios com sangramento à sondagem, IP%: porcentagem de índice de placa, IG%: índice gengival.

5.2 Resultados Microbiológicos

Os dados microbiológicos foram obtidos através de PCR em tempo real, que apresenta o número de cópias do gene *16S rRNA* da espécie bacteriana analisada em cada amostra. O PCR foi realizado dentro de todos os cuidados para obtenção de uma boa análise (ANEXO C). A quantidade de micro-organismos em um sítio é representada na casa dos milhares e possui uma variabilidade muito grande, então, por conveniência e para facilitar as análises estatísticas foi calculado o log na base 10 dessas medidas (Field et al., 2012). Quando comparamos os grupos com relação à quantidade de bactérias nas bolsas rasas (Mann-Witney), os grupos são diferentes para a quantificação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* na avaliação de 6 meses. No entanto, quando comparamos as diferenças (log final- log inicial), não houve diminuição significativa entre os grupos para nenhuma das bactérias. Com relação à diminuição do número de bactérias em cada um dos tratamentos (Wilcoxon), houve uma diminuição significativa para *Tannerella forsythia* no grupo TPI.

Tabela 5.3- Comparação entre os $\log_{10}$ do número de cópias do gene *16S rRNA* (das bactérias avaliadas (sítios rasos))

			Sítios rasos			p**
			Inicial	Final	Diferença	
			Mediana	Mediana	(log final – log inicial)	
			(25%; 75%)	(25%; 75%)	Mediana (25%; 75%)	
Pg	log (n=10)	TPS	2,28 (1,45 ; 3,97)	2,88 (2,65; 3,72)	0,96 (-0,80; 1,31)	0,432
	log (n=10)	TPI	2,48 (2,3; 2,75)	2,44 (2,27; 2,71)	-0,18 (-0,22; -0,01)	0,322
	p*		0,739	0,018*	0,218	
Td	log (n=10)	TPS	4,12 (2,36; 4,42)	3,85 (3,64; 4,13)	-0,07 (-0,49; 0,74)	0,922
	log (n=10)	TPI	3,74 (2,86; 4,19)	3,77 (2,83; 4)	-0,12 (-0,25; 0,24)	0,770
	p*		0,739	0,631	0,912	
Tf	log (n=10)	TPS	1,38 (0,53; 3,05)	1,37 (0,41; 2,16)	-0,05 (-1,95; 0,24)	0,492
	log (n=10)	TPI	2,25 (1,16; 2,8)	1,03 (0,83; 1,4)	-0,97 (-1,63, -0,46)	0,014**
	p*		0,579	0,739	0,436	
Aa	log (n=10)	TPS	3,21 (1,94; 4,56)	2,5 (3,31; 5,69)	0,73 (-0,21; 3,39)	0,160
	log (n=10)	TPI	2,9 (2,73; 4,53)	4,58 (2,55; 3,34)	0,05 (-1,74; 0,75)	0,922
	p		0,88	0,026*	0,165	
Universal	log (n=10)	TPS	8,67 (7,37; 9,01)	8,29 (8,31; 4,31)	-0,08 (-0,52; 1,01)	0,922
	log (n=10)	TPI	8,04 (7,33; 8,64)	8,38 (7,87; 8,77)	-0,02 (-1,03; 0,98)	0,999
	p*		0,796	0,971	0,971	

**Teste estatístico Wilcoxon. *Teste estatístico Mann-Whitney. Diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. TPS: Grupo de pacientes submetidos a raspagem supragengival e TPI: Grupo de pacientes submetidos a raspagem e alisamento corono-radicular. Pg: *Porphyromonas gingivalis* Td: *Treponema denticola* Tf: *Tannerella forsythia* Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Quando comparamos os grupos com relação à quantidade de bactérias nas bolsas profundas (Mann-Whitney), os grupos são diferentes para a medida de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na avaliação inicial. No entanto, quando comparamos as diferenças (log final- log inicial), não houve diminuição significativa entre os grupos para nenhuma das bactérias avaliadas. Também não houve diminuição significativa do número de bactérias em cada um dos tratamentos (Wilcoxon), para nenhuma das bactérias avaliadas (Tabela 5.4).

Tabela 5.4- Comparação entre os log₁₀ do número de cópias do gene 16S rRNA das bactérias avaliadas (sítios profundos)

			Sítios profundos			
			Inicial	Final	Diferença	
			Mediana	Mediana	(log final – log inicial)	p**
			(25%; 75%)	(25%; 75%)		
Pg	log (n=10)	TPS	4,76 (2,63; 5,49)	3,82 (2,87; 5,61)	0,59 (-0,33; 1,13)	0,625
	log (n=10)	TPI	4,94 (4,56; 5,64)	3,48 (2,5; 4,26)	-1,08 (-2,13; 0,42)	0,131
	p*		0,579	0,436	0,19	
Td	log (n=10)	TPS	4,41 (3,92; 5,22)	4,09 (4; 4,3)	-0,3 (-1,2; 0,88)	0,557
	log (n=10)	TPI	4,59 (4,3; 5,37)	4,02 (3,32; 4,95)	-0,55 (-1,4; 0,39)	0,232
	p*		0,739	0,796	0,739	
Tf	log (n=10)	TPS	4,37 (3,5; 4,62)	4,06 (1,58; 7,68)	-0,81 (-1,82; 2,6)	0,999
	log (n=10)	TPI	4,43 (2,81; 5,38)	1,8 (1,26; 3,99)	-1,52 (-2,26; -0,29)	0,124
	p*		0,999	0,29	0,28	
Aa	log (n=10)	TPS	4,52 (1,02; 3,55)	2,74 (2,27; 3,82)	0,73 (-0,69; 2,39)	0,155
	log (n=10)	TPI	3,09 (3,19; 5,98)	3,6 (2,6; 5,2)	-0,57 (-1,24; -0,43)	0,275
	p*		0,035*	0,631	0,143	
Universal	log (n=10)	TPS	9,77 (9,02; 10,95)	9,5 (8,6; 11,8)	0 (-0,43; 0,89)	0,846
	log (n=10)	TPI	9,22 (8,91; 9,9)	9,57 (8,6; 10,67)	-0,33 (-0,62; 0,93)	0,999
	p*		0,684	0,999	0,853	

**Teste estatístico Wilcoxon. *Teste estatístico Mann-Whitney. Diferença estatisticamente significativa quando p<0,05. TPS: Grupo de pacientes submetidos a raspagem supragengival e TPI: Grupo de pacientes submetidos a raspagem e alisamento corono-radicular. . Pg: *Porphyromonas gingivalis* Td: *Treponema denticola* Tf: *Tannerella forsythia* Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Na Tabela 5.5 não analisamos o log do número de cópias do gene 16S rRNA das bactérias, mas a razão do número de cópias de cada bactéria com relação ao número de cópias total (Universal), nas bolsas rasas. Como os valores das proporções são em geral muito pequenos, os valores foram escritos em notação científica, na qual 1e-03 é igual a 0,001 (por exemplo). Existe diferença significativa entre os grupos para *Porphyromonas gingivalis* (p= 0,043) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (p= 0,019) na avaliação de 6 meses. Com relação à diminuição para cada um dos tratamentos após 6 meses, TPI foi capaz de reduzir significativamente o número de *Tannerella forsythia* nas bolsas rasas (p=0,004).

Tabela 5.5- Comparação entre as proporções do número de cópias do gene *16S rRNA* das bactérias avaliadas com relação ao número obtido de bactérias totais pela utilização do primer universal (sítios rasos)

		Sítios rasos			p**
		Inicial Mediana (25%; 75%)	Final Mediana (25%; 75%)	Diferença (final – inicial)	
Pg/Universal	TPS (n=10)	9,13E-06 (1,65E-06; 1,33E-05)	5,30E-06 (2,91E-06; 2,37E-05)	9,17E-07 (-3,09E-06; 2,11E-05)	0,625
	TPI (n=10)	3,87E-06 (8,89E-07; 1,16E-05)	1,73E-06 (8,15E-07; 1,91E-06)	-1,28E-06 (-9,18E-06; 9,54E-08)	0,084
	p*	0,684	0,043*	0,218	
Td/Universal	TPS (n=10)	1,68E-05 (6,51E-06; 8,49E-05)	2,05E-05 (1,09E-05; 4,25E-05)	-9,42E-06 (-4,59E-05; 1,70E-05)	0,492
	TPI (n=10)	1,14E-05 (4,47E-06; 1,03E-04)	1,78E-05 (5,70E-06; 4,43E-05)	-2,32E-06 (-7,86E-05; 7,28E-06)	0,625
	p*	0,739	0,684	0,912	
Tf/Universal	TPS (n=10)	5,87E-07 (6,72E-08; 1,29E-06)	9,97E-08 (2,82E-08; 4,42E-07)	-5,46E-07 (-8,89E-07; -4,02E-08)	0,084
	TPI (n=10)	1,49E-06 (3,13E-07; 1,94E-06)	1,09E-07 (2,48E-08; 1,59E-07)	-1,35E-06 (-1,82E-06; -2,26E-07)	0,004**
	p*	0,436	0,971	0,393	
Aa/Universal	TPS (n=10)	2,56E-05 (8,78E-08; 1,01E-04)	1,73E-04 (1,49E-05; 2,43E-03)	2,68E-05 (-8,55E-05; 2,30E-03)	0,432
	TPI (n=10)	3,21E-05 (3,82E-06; 2,94E-04)	1,21E-06 (7,45E-07; 7,95E-06)	-3,13E-05 (-2,92E-04; 7,30E-06)	0,232
	p*	0,597	0,019*	0,28	

**Teste estatístico Wilcoxon. *Teste estatístico Mann-Whitney. Diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. TPS: Grupo de pacientes submetidos à raspagem supragengival e TPI: Grupo de pacientes submetidos a raspagem e alisamento corono-radicular. Pg: *Porphyromonas Gingivalis* Td: *Treponema denticola* Tf: *Tannerella forsythia* Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Na tabela 5.6, assim como na 5.5, analisamos a razão do número de cópias de cada bactéria com relação ao número de cópias total (Universal) nas bolsas profundas. Os valores das proporções também foram escritos em notação científica. Não houve diferença significativa entre os grupos para nenhuma das bactérias avaliadas (Mann-Witney). No entanto, na comparação entre os grupos com relação à diferença (log final- log inicial), vale ressaltar que a diferença na diminuição das proporções entre os tratamentos para a *Tannerella forsythia* se aproximou muito do nível de significância ($p=0,052$). Com relação à diminuição para cada um dos tratamentos após 6 meses (Wilcoxon), TPI foi capaz de reduzir significativamente o número de *Porphyromonas gingivalis* nas bolsas profundas.

Tabela 5.6- Comparação entre as proporções do número de cópias do gene *16SrRNA* das bactérias avaliadas com relação ao universal (sítios profundos)

		Sítios profundos			p**
		Inicial Mediana (25%; 75%)	Final Mediana (25%; 75%)	Diferença (final – inicial)	
Pg/Universal	TPS (n=10)	1,69E-06 (4,06E-08; 1,65E-05)	4,65E-06 (6,51E-07; 1,24E-05)	2,49E-08 (-4,23E-06; 3,26E-06)	0,846
	TPI (n=10)	3,94E-05 (7,87E-07; 7,64E-05)	8,67E-07 (7,57E-08; 4,83E-06)	-3,94E-05 (-5,61E-05; -3,06E-07)	0,037**
	p*	0,247	0,436	0,28	
Td/Universal	TPS (n=10)	8,23E-06 (5,96E-07; 4,01E-05)	2,27E-06 (2,34E-07; 2,73E-05)	-4,52E-07 (-3,88E-05; 1,46E-05)	0,77
	TPI (n=10)	2,50E-05 (1,02E-05; 8,26E-05)	7,69E-06 (2,20E-07; 4,58E-05)	-2,49E-05 (-6,91E-05; -5,99E-06)	0,322
	p*	0,529	0,796	0,739	
Tf/Universal	TPS (n=10)	3,26E-06 (3,92E-07; 6,52E-06)	2,03E-06 (1,24E-07; 4,95E-05)	1,59E-06 (-2,62E-06; 4,35E-05)	0,322
	TPI (n=10)	1,24E-05 (5,06E-07; 1,92E-05)	1,69E-07 (4,54E-08; 1,99E-06)	-6,38E-06 (-1,83E-05; -5,14E-08)	0,084
	p*	0,315	0,165	0,052	
Aa/Universal	TPS (n=10)	3,72E-07 (4,26E-10; 7,74E-06)	4,07E-06 (7,19E-08; 1,10E-05)	3,70E-06 (-4,75E-06; 1,10E-05)	0,286
	TPI (n=10)	5,77E-06 (8,20E-07; 8,67E-04)	5,48E-06 (5,49E-07; 1,51E-05)	-9,03E-07 (-8,60E-04; 3,43E-06)	0,322
	p*	0,089	0,796	0,165	

**Teste estatístico Wilcoxon. *Teste estatístico Mann-Whitney . Diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. TPS: Grupo de pacientes submetidos a raspagem supragengival e TPI: Grupo de pacientes submetidos a raspagem e alisamento corono-radicular. Pg: *Porphyromonas gingivalis* Td: *Treponema denticola* Tf: *Tannerella forsythia* Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito da terapia periodontal supragengival (raspagem e polimento supragengival), nos níveis subgengivais de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* e no nível total de bactérias (Universal) em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 com periodontite crônica generalizada. Também se propôs avaliar secundariamente o efeito do tratamento periodontal supragengival nos parâmetros clínicos periodontais. Foi usado como controle o grupo TPI, no qual foi realizado raspagem e alisamento corono-radicular (padrão ouro para o tratamento periodontal). A hipótese deste trabalho é de que a terapia periodontal supragengival, consistindo em métodos para a remoção de biofilme/cálculo supragengival, polimento da superfície dental e orientações mensais de higiene durante 6 meses pode afetar os níveis dos principais periodontopatógenos, nos pacientes diabéticos após 6 meses.

Não foi possível realizar comparações diretas com outros estudos clínicos, pois não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que avalie o efeito da terapia supragengival na microbiota de pacientes diabéticos. Durante a busca da literatura, foram encontrados vários trabalhos que avaliaram o efeito do controle de biofilme supragengival em pacientes sistemicamente saudáveis (Kho et al., 1985; Beltrami et al., 1987; Loos et al., 1988; Dahlén et al., 1992; McNabb et al., 1992; Hellstrom et al., 1996) e também em pacientes fumantes (Gomes et al., 2008; Meulman et al., 2012). Além disso, foram encontrados alguns trabalhos que avaliaram os efeitos clínico e microbiológico da raspagem e alisamento corono radicular (TPI) em pacientes diabéticos (Christagau et al., 1998; Cruz et al., 2008) .

Os resultados deste estudo não mostraram nenhuma redução significativa para as bactérias analisadas no grupo TPS (grupo teste), o que está de acordo com alguns autores que mostraram que apenas o controle de placa dental supragengival não é capaz de alterar a composição da microbiota subgengival em pacientes sistemicamente saudáveis (Kho et al., 1985; Loos et al., 1988; Hellstrom et al., 1992). Kho et al. (1985), ao analisarem 1 sítio profundo de 8 pacientes com doença periodontal crônica mantidos em um programa de controle de placa supragengival (1 visita semanal durante 3 semanas consecutivas, no qual instruções de higiene bucal e profilaxia profissional eram realizadas), através de análise por cultura, no início do

estudo, 8 e 16 semanas após a última profilaxia, não encontraram nenhuma diferença significativa nos níveis microbiológicos em nenhum dos períodos de avaliação. Loos et al. (1988) selecionaram 15 indivíduos que, após uma avaliação inicial, foram orientados e motivados com relação ao controle de placa supragengival. Os voluntários voltaram 6 semanas após o exame para reforço da motivação. Foram observadas melhoras no padrão de higiene bucal e na condição gengival; mas nenhuma alteração microbiológica no ambiente subgengival, analisada pelo método de cultura, foi observada 12 semanas após a consulta inicial.

Por outro lado, os resultados deste estudo discordam de alguns estudos que encontraram alterações microbiológicas benéficas no ambiente subgengival, após o controle da placa supragengival (Dahlén et al., 1992; McNabb et al., 1992; Hellstrom et al., 1996; Westfelt et al., 1998). Dahlén et al. (1992) após a supervisão meticulosa da remoção da placa supragengival por meio de instrução de higiene bucal, relataram alterações benéficas na composição da biofilme subgengival em sítios com PCS > 4 mm em um período de 2 anos. Esses resultados estão de acordo com os achados de McNabb et al. (1992), que encontraram melhoras clínicas e microbiológicas, com relação à redução de *P. gingivalis* e espiroquetas em sítios moderados (4 a 5 mm). Os achados de Hellstrom et al. (1996) indicaram que o repetido controle de placa profissional combinado com a higiene oral feita pelo paciente reduziu a contagem total de bactérias e a prevalência de *P. gingivalis* em bolsas moderadas e profundas, independentemente da característica do sítio tratado. Westfelt et al. (1998) também observaram uma redução no número total de bactérias na análise de 12 meses de pacientes submetidos ao controle de placa supragengival, acompanhados por 3 anos e recebendo OHB a cada 3 meses.

Os diferentes resultados encontrados com relação ao efeito do controle do biofilme supragengival na ausência da raspagem e alisamento radicular, também podem ser atribuídos às diferentes metodologias clínicas, à extensão do controle supragengival e à profundidade inicial de sondagem. Petersilka et al. (2002) relataram, em revisão de literatura, que o controle de placa supragengival afetaria a microbiota subgengival apenas 3 mm abaixo da margem gengival. Em nosso estudo, mesmo nos sítios rasos (até 3mm), não observamos alterações significativas para os níveis de nenhuma das bactérias analisadas para o tratamento supragengival.

Outro fator que deve ser considerado neste estudo é o fato de a população avaliada para as alterações microbiológicas ser um grupo de pacientes diabéticos.

Cruz et al. (2008), através do PCR convencional, demonstraram não haver redução de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em diabéticos após 3 meses da realização de raspagem e alisamento corono-radicular.

Para o grupo controle deste estudo foram observadas algumas reduções significativas, tanto na quantidade individual da bactéria *Tannerella forsythia* em bolsas rasas, quanto na comparação entre as proporções de *Tannerella forsythia* com relação ao Universal nas bolsas rasas e *Porphyromonas gingivalis* com relação ao Universal nas bolsas profundas. Nas demais bactérias, não foi possível observar uma redução significativa. Cruz et al. (2008) também observaram uma redução significativa na frequência de *T. forsythia* após 3 meses do tratamento através da utilização de PCR convencional. Apesar desse último estudo corroborar com os resultados obtidos no presente estudo deve-se atentar que a metodologia do PCR convencional é menos sensível à detecção e quantificação do que o PCR em tempo real (Kubista et al., 2006).

É importante ressaltar a grande diferença entre as técnicas utilizadas. Todos os estudos citados até aqui, exceto o de Cruz et al. (2008), fizeram as análises microbiológicas através de cultura. A cultura possui várias limitações e exigências, como a necessidade de preservar a viabilidade bacteriana, dificuldade de recuperar espécies cultiváveis quando estas são encontradas em número reduzido, incapacidade de detectar microrganismos em baixas proporções (Sakamoto et al., 2002; Lau et al., 2004).

Espécies importantes relacionadas à doença periodontal como, por exemplo, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, exigem condições rigorosas para seu crescimento e são difíceis de serem detectadas e quantificadas através de métodos convencionais de cultura bacteriana (Rudney et al., 2003). A técnica utilizada neste estudo é bem mais específica; o PCR em tempo real detecta espécies viáveis e não viáveis para o meio de cultura e possui boa especificidade, que lhe permite distinguir patógenos alvos de numerosas espécies presentes na cavidade bucal, o que não é possível pela técnica de cultura bacteriana (Higuchi et al., 1992).

Cruz et al. (2008) utilizaram para as suas análises o PCR convencional, que é inferior ao PCR em tempo real com relação à sensibilidade e especificidade da técnica (Kubista et al., 2006).

Deve-se ressaltar que a técnica do PCR em tempo real também apresenta as suas limitações. O PCR em tempo real é baseado na identificação de uma pequena

subunidade do RNA ribossomal (16S rRNA). No entanto, a presença de mosaicismos e da heterogeneidade intra-genômica podem gerar um viés na amplificação por PCR, resultando em algum erro na representação da diversidade microbiana (Rajendhran; Gunasekaran, 2011).

Além disso, apesar da *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. denticola* serem considerados agentes etiológicos primários no desenvolvimento da doença periodontal (DP) (Kobayashi et al., 2009), a composição microbiana subgengival em pacientes com doença periodontal sofre mudanças extremamente diversas. Mais de 400 fenótipos foram detectados por métodos de biologia molecular em sítios afetados pela doença periodontal (Wade, 2011). Griffen et al. (2012), descobriram que aproximadamente 123 desses fenótipos bacterianos estão elevados no biofilme subgengival durante a doença periodontal: além de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, e *Tannerella forsythia*, uma variedade de outras bactérias, incluindo espécies dos filos *Bacteroidetes* e *Synergistetes* e dos gêneros *Peptostreptococcus* e *Dialister*, além das espécies *Eubacterium saphenum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola*, *Parvimonas micra*, *Filifactor alocis* estão intimamente relacionadas com a ocorrência de periodontite (Dahlén; Leonhardt, 2006; Paster et al. 2006).

Além do grande número e da diversidade de bactérias envolvidas nesse processo, a resposta imunológica é uma parte importante para ocorrência da doença periodontal (Kinane; Hart, 2003).

É claro que uma grande quantidade de micro-organismos é removida após o tratamento, e outra quantidade é deixada para trás; não é possível eliminar completamente as bactérias do sítio subgengival nem mesmo com a raspagem subgengival. Além disso, em um pequeno período de tempo (1 a 2 semanas), a quantidade total de bactérias volta aos níveis iniciais. Em um nível biológico, não é desejável que a terapia periodontal altere a maioria da microbiota subgengival. Se a terapia alterasse o equilíbrio da microbiota subgengival, é bem provável que o sítio ficaria suscetível a uma superinfecção por outro complexo microbiano. Já foi demonstrado que pacientes que não respondem bem clinicamente ao tratamento periodontal possuem níveis iniciais de periodontopatógenos baixos (Haffajee et al., 1997).

Vários estudos já mostraram que a resposta do hospedeiro é determinada como fator chave na expressão da doença periodontal (Darveau et al., 1997;

Kornman et al., 1997; Socransky et al., 1998; Kinane; Hart, 2003). Embora a infecção por periodontopatógenos seja essencial para o início da DP, sua mera presença na cavidade bucal não é suficiente para explicar diferenças entre os indivíduos na severidade da doença (Kornman et al., 1997). Como já foi citado, o Diabetes Mellitus é um importante elemento que pode exercer influência sobre a incidência, prevalência e severidade da doença periodontal (Novaes et al., 1997). Dentro desse contexto, é possível explicar a grande variação entre as quantidades desses patógenos no baseline dos pacientes avaliados no presente estudo. Essa grande variação pode ter sido responsável pela ausência de diferenças significativas após o tratamento no grupo teste e poucas diferenças no grupo controle. Portanto, tanto bactérias com potencial patogênico quanto a qualidade da resposta do hospedeiro parecem constituir dois importantes aspectos da etiologia da DP (Kornman et al., 1997; Socransky et al., 1998; Kinane; Hart, 2003; Salvi; Lang, 2005).

O efeito do controle da placa supragengival nos parâmetros clínicos da DP tem sido investigado, e alguns estudos mostram uma pequena, ou nenhuma mudança na profundidade de sondagem (Kho et al., 1985; Beltrami et al., 1987; McNabb et al., 1992; Lang; Loe, 1993; Hellstrom et al., 1996). Neste estudo, houve uma diferença significativa na mudança da profundidade clínica de sondagem seis meses após a terapia. O que está de acordo com outros estudos que mostraram que a remoção profissional do biofilme supragengival, aliada à adequada higiene oral, leva à melhora dos parâmetros clínicos periodontais (Al-Yahfoufi et al., 1995; Westfelt et al., 1998; Ximenes-Fyvie et al., 2000). Uma série de fatores pode ser responsável por essa discrepância entre os estudos como, por exemplo, diferentes profundidades de sondagem inicial, presença de lesões de furca, qualidade do controle de placa e até mesmo erros metodológicos dos estudos, como falta de cegamento e calibração dos examinadores (Kho et al., 1985; McNabb et al., 1992; Lang; Loe, 1993; Hellstrom et al., 1996).

Para todos os parâmetros clínicos analisados, ambos os grupos obtiveram melhoras significativas, exceto para supuração no grupo teste. Houve uma diferença significativa entre os grupos com relação à PCS e SS após 6 meses do tratamento. Para ambos, a melhora no grupo TPI foi maior do que no grupo TPS, corroborando com estudos que compararam as duas intervenções em pacientes saudáveis (Kaldahl et al., 1996; Westfelt et al., 1998).

Reduções significativas no IP e IG foram observadas em ambos os grupos após 6 meses, o que mostra a efetividade do programa de orientação de higiene adotado nesse estudo.

É interessante ressaltar que, embora, vários estudos mostrem em diferentes níveis os efeitos benéficos do controle do biofilme supragengival (Dahlén et al., 1992; Al-Yahfoufi et al., 1995; Hellstrom et al., 1996), ele não deve ser usado como o único tratamento para a doença periodontal crônica. Westfelt et al. (1998) relataram que vários sítios no grupo, que recebeu apenas instrução de higiene oral e raspagem supragengival, mostraram uma perda adicional no NCI, (≥ 2 milímetros), quando comparado ao grupo que recebeu também a terapia subgengival no acompanhamento de 3 anos. Os sítios que receberam a raspagem subgengival (controle), ao menos permaneceram estáveis no acompanhamento a longo prazo.

Sugere-se, desta forma, que o impacto do controle supragengival no biofilme subgengival seja mais investigado, devendo-se realizar novos estudos que se preocupem em distinguir a resposta microbiológica somente ao tratamento supragengival da resposta ao tratamento subgengival em diabéticos. É aconselhável que técnicas capazes de analisar a diversidade microbiológica e não apenas algumas bactérias selecionadas, sejam utilizadas.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações desse estudo, a terapia supragengival em pacientes diabéticos parece não ter efeito significativo na resposta microbiológica de sítios subgengivais rasos e profundos dos mesmos.

O controle supragengival é uma importante ferramenta para a melhora nos parâmetros clínicos periodontais e, portanto, faz-se importante para a população portadora de diabetes tipo 2.

REFERÊNCIAS¹

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J*. 1975; 25(4):229-35.

Al-Yahfoufi Z, Mombelli A, Wicki A, Lang NP. The effect of plaque control in subjects with shallow pockets and high prevalence of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*. 1995;22:78-84.

Ali RW, Lie T, Skaug N. Early effects of periodontal therapy on the detection frequency of four putative periodontal pathogens in adults. *J Periodontol*. 1992;63(6):540-7.

Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains FimA genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(5):1426-1430.

American Academy of Periodontology. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-112.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2013; 36(1):S67-74.

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.

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1996; 11(4): 266-273.

Axelsson P, Nyström B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol*. 2004 Sep;31(9):749-57.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Baynes JW, Bunn HF, Goldstein D, Harris M, Martin DB, Peterson C et al. National Diabetes Data Group: report of the expert committee on glucosylated hemoglobin. *Diabetes Care*. 1984;7(6):602-6.

Beltrami M, Bickel M, Baehni PC. The effect of supragingival plaque control on the composition of the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1987;14:161-4.

Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*. 2005;84(1):9-20.

Brasil.VIGITEL Brasil 2011. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico [citado 2 nov 2013]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Mai/09/Vigitel_2011_diabetes_final.pdf>.

Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol*. 2005;76: 418-25.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Rosalém W, Mendes MC, Souto RM, et al. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *J Periodontol*. 2005;76(5):778-84.

Christgau M, Palitzsch KD, Schmalz G, Kreiner U, Frenzel S. Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: Clinical, microbiological, and immunologic results. *J Clin Periodontol*. 1998;25:112-124.

Cruz GA, de Toledo S, Sallum EA, Sallum AW, Ambrosano GM, de Cássia Orlandi Sardi J, et al. Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2008;79(7):1150-7.

Dahlén G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okamoto H. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1992;19:802-9.

Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(1):6-11.

Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997;14:12-32.

Doungudomdacha S, Rawlinson A, Walsh TF, Douglas CW. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol*. 2001;28:437-445.

Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2008;79:637-46.

Feres M, Gursky LC, Faveri M, Tsuzuki CO, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2009;36(10):857-67.

Field C A, Gidley MD, Preshaw PM, Jakubovics N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J periodont res*. 2012;47(4):470-8.

Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem*. 1996;271:9982-6.

Golub LM, Nicoll GA, Iacono VJ, Ramamurthy NS. In vivo crevicular leukocyte response to a chemotactic challenge: inhibition by experimental diabetes. *Infect Immun*. 1982;37:1013-20.

Gomes SC, Nonnenmacher C, Susin C, Oppermann RV, Mutters R, Marcantonio RAC. The effect of supragingival plaque control regimen on the Subgingival Microbiota in Smokers and Never-Smokers: Evaluation by Real-Time Polymerase Chain Reaction in periodontitis. *J Periodontol*. 2008;79(12):2297-304.

Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*. 2012;6:1176–85.

Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):51-61.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol*. 1997;24(10):767-76.

Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbiological complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:196–205.

He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*. 2004;145(1):447-52.

Hellstrom MK, Ramberg P, Krok L, Lindhe J. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1996;23:934-40.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Biotechnol*. 1992;10:413–17.

Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999;341(25):1906-12.

Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Molvar MP, Dyer JK. Long-term evaluation of periodontal therapy (II) Incidence of sites breaking down. *J Periodontol*. 1996;67:103-8.

Kho P, Smales FC, Hardie JM. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol*. 1985;12:676-86.

Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14:430-49.

Kobayashi T, Nagata T, Murakami S, Takashiba S, Kurihara H, Izumi Y, et al. Genetic risk factors for periodontitis in a Japanese population. *J Dent Res*. 2009;88:1137-41.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997;24:72-7.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.

Lang NP, Löe H. Clinical management of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1993;2:128-39.

Lang NP, Lindhe J, van der Velden U; European Workshop in Periodontology group D. Advances in the prevention of periodontitis. Group D consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005;32 (S6):291-3.

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 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2004;31:1061-9.

Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky S, Heijl L, Bratthall G. Healing following surgical/non surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982; 9:115–28.

Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1993;16(1):329-34.

Loos B, Claffey N, Crigger M. Effect of oral hygiene measures on clinical and microbiological parameters of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1988;15:211-6.

Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol.* 1984;11:193–207.

Mandell RL, Dirienzo J, Kent R, Joshipura K, Haber J. Microbiology of healthy and diseased periodontal sites in poorly controlled insulin dependent diabetics. *J Periodontol.* 1992;63:274-9.

Manouchehr-Pour M, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Blissada NF. Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease. *J Periodontol.* 1981;52:410-5.

Mashimo PA, Yamamoto Y, Slots J, Park BH, Genco RJ. The periodontal microflora of juvenilediabetics. Culture, immunofluorescence, *J Periodontol.* 1983;54(7):420-30.

McNabb H, Mombelli A, Lang NP. Supragingival cleaning 3 times a week. The microbiological effects in moderately deep pockets. *J Clin Periodontol.* 1992;9:2348-56.

Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006;77(8):1289-303.

Meulman T, Casarin RC, Peruzzo DC, Giorgetti AP, Barbagallo A, Casati MZ, et al. Impact of supragingival therapy on subgingival microbial profile in smokers versus non-smokers with severe chronic periodontitis. *J Oral Microbiol.* 2012; 4:8640-8.

Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. *Diabetes.* 1996;45(S3):67-72.

Muller YL, Infante AM, Hanson RL, Love-Gregory L, Knowler W, Bogardus C, et al. Variants in hepatocyte nuclear factor 4alpha are modestly associated with type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes.* 2005;54(10):3035-9.

Nogueira Moreira A, Luna Davila G, Bianchini H, Alonso C, Piovano S. Effect of supragingival plaque control on subgingival microflora and gingivo-periodontal tissues. *Acta Odontol Latinoam.* 2000;13:73-86.

Novaes AB Jr, Silva MA, Batista EL Jr, dos Anjos BA, Novaes AB, Pereira AL. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of Young brazilian patients. A 10-year follow-up study. *J Periodontol.* 1997;68(4):328-334.

Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol.* 1996;1(1):1-36.

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.

Pedrazzoli V, Kilian M, Karring T, Kirkegaard E. Effect of surgical and non-surgical periodontal treatment on periodontal status and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 1991;18(8):598-604.

Petersilka GJ, Ehmke B, Flemming TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000.* 2002;28(2):56-71.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005; 366:1809–0.

Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res*. 2011;166: 99—110.

Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA et al. Identification of Pathogen and Host Response Markers Correlated With Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2009;80:436-46.

Rosling B, Nyman S, Lindhe J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. *J Clin Periodontol*. 1976;3:38–53.

Rossi V, Piccinin FB, Oppermann RV, Gomes SC. Effect of supragingival plaque control on periodontal disease in smokers – a systematic review. *Odonto*. 2012; 20(39):157-64.

Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*. 2003;38:465-70.

Sakamoto M, Huang Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Detection of novel oral phylotypes associated with periodontitis. *EMS Microbiol Lett*. 2002;217(1):65-9.

Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2005;32(S6):108-29.

Sbordone L, Ramaglia L, Borone A, Ciaglia RN, Tenore A, Iacono VJ. Periodontal status and selected cultivable anaerobic microflora of insulin-dependent juvenile diabetics. *J Periodontol*. 1995;66:452-61.

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; 39(2):97-107.

Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilms of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*. 2007;9:975-82.

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

Soskolne WA, Klinger A. The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol.* 2001;6(1):91-8.

Teixeira SRL, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MRL, et al. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009; 36: 482-487.

Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002; 251:87-101.

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.

Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *J Clin Periodontol.* 2011;38 (S11):7-16.

Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Lindhe J. Significance of frequency of professional tooth cleaning for healing following periodontal surgery. *J Clin Periodontol.* 1983;10:148–56.

Westfelt E, Rylander H, Dafilen G, Lindhe J. The effect of supragingival plaque control on the progression of advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1998;25:536-41.

World Health Organization. Media Centre/ Diabetes. Fact sheet no 312 [cited 2013 Nov 1]. Reviewed October 2013. Available from:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>>.

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Tratamento Periodontal e Controle Metabólico em pacientes portadores de Diabetes Tipo 2

1. Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal:

Nome: _____ N° do Documento de Identidade: _____

Sexo: M () F ()

Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Bairro: _____

Estado: _____ CEP: _____ Telefone: () _____

2. Informações sobre a pesquisa científica:

Este documento contém informações sobre esta pesquisa, da qual o Sr. (a) poderá participar. Por favor, leia atentamente e, em caso de dúvidas, estaremos à sua disposição para esclarecimentos.

2.1. Objetivos da pesquisa

Esta pesquisa pretende verificar se o tratamento da sua gengiva traz melhoras para a sua condição, no que se diz respeito à Diabetes Tipo 2.

2.2. Benefícios ao paciente

A pesquisa dará ao Sr. (a) o diagnóstico de sua condição periodontal, além do tratamento odontológico, que deve resultar na melhora da sua saúde bucal.

2.3. O que será realizado no paciente

Após sua seleção e seu consentimento, devidamente assinado ao final deste termo, o Sr. (a) será encaminhado para a clínica de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da USP, localizada na Av. Prof. Lineu Prestes, 2222, Cidade Universitária, onde serão realizadas as consultas odontológicas, para o exame e tratamento periodontal, assim como a coleta de sangue. Serão realizados: exame gengival, que visa saber a condição de sua gengiva; orientação de higiene bucal e o tratamento periodontal, que é a raspagem dos dentes para remover a placa e o tártaro acumulados. A raspagem será feita sob anestesia, se preciso. Iremos também recolher amostras de sangue em todas as visitas que o Sr. (a) comparecer, para podermos analisar sua glicemia e outros valores que podem influenciar sua diabetes, e também iremos aferir sua pressão arterial. Em torno de 2 meses após o primeiro tratamento, iremos fazer um novo exame gengival, e, se preciso, iremos complementar o tratamento. A complementação do tratamento pode ser com apenas uma nova sessão de raspagem, ou uma cirurgia de gengiva, que visa melhorar as áreas que ainda estiverem inflamadas. Esses procedimentos são seguros e não provocam dano físico ou moral ao Sr. (a). Em caso de eventuais dúvidas relacionadas aos aspectos éticos da pesquisa, disponibilizamos o endereço do comitê de ética em pesquisa da UNIFESP: Rua Botucatu, 572- 1^o andar - conj. 14-CEP 04023-062-São Paulo/ Brasil. Telefone: (11) 5571-1062/ (11) 5539-7162.

2.4. Se houver necessidade de outro exame para diagnóstico?

Caso haja necessidade, os exames odontológicos e de sangue serão repetidos.

2.5. Compensação

Não há previsão de indenizações ou pagamentos aos pacientes, pois não existirão gastos ou riscos graves relacionados à pesquisa. Os procedimentos realizados farão parte de rotina de tratamento.

2.6. Garantias ao paciente

Como participante dessa pesquisa, o Sr. (a) terá acesso aos resultados obtidos e permitirá o acesso dos mesmos aos pesquisadores envolvidos e aos membros da Comissão de Ética. Os resultados desse trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, sendo a identidade do Sr. (a) sempre preservada. O Sr.(a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa. Além disso, o Sr. (a) terá direito à privacidade e todas as informações obtidas dos prontuários clínicos e ambulatoriais, permanecerão confidenciais, nos âmbitos da lei, assegurando a proteção de sua imagem e identidade. Está assegurada ao Sr.(a) a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, e de deixar de participar da pesquisa, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo. Caso seja necessário, o contato com os pesquisadores responsáveis poderá ser feito pelos telefones: Adriana Foz (98293-2299), Giovane Gomes (97144-5609) e Hilana Artese (97896-5536). Em caso de dano decorrente ao estudo, os pesquisadores responsáveis prestarão assistência integral ao paciente que sofreu o dano.

CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

Declaro que, tendo lido e compreendido o termo de informação e consentimento para a pesquisa clínica, concordo em participar deste estudo. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento, sem penalidades. Autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores para a publicação em revistas científicas e apresentação em Congressos. Recebi uma cópia do termo de informação para participar da pesquisa. Todas as páginas do termo de consentimento livre e esclarecido devem ser rubricadas pelo pesquisador principal e pelo paciente/responsável legal.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador

São Paulo, _____ de _____ de ____.

Anexo A - Parecer de aprovação Comitê de Ética FOU SP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 284313
Protocolo 127/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Tratamento periodontal e controle metabólico de pacientes com diabetes tipo 2"**, de responsabilidade dos Pesquisadores Adriana Moura Foz, Giovane Hisse Gomes e Hilana P.C. Artese e Mariana de Sousa Rabelo, sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a.) Giuseppe Alexandre Romito.

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, 12 de novembro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Anexo B - Parecer de aprovação do Comitê de Ética UNIFESP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 1 de julho de 2011.
CEP 0629/11

Ilmo(a). Sr(a).
 Pesquisador(a) Hilana Paula Carillo Artese
 Co-Investigadores: Sergio Atala Dib, Giuseppe Alexandre Romito (orientador)
 Disciplina/Departamento: Endocrinologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
 Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Tratamento periodontal e controle metabólico em pacientes portadores de diabetes tipo 2”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção terapêutica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.

OBJETIVOS: Verificar a eficácia da terapia periodontal intensiva (cirúrgica e não-cirúrgica) comparada à terapia periodontal supragengival (raspagem e polimento supragengival) no controle glicêmico (HbA1c) de indivíduos com DMT2 em um período de 12 meses..

RESUMO: A população estudada será de 120 pacientes, diagnosticados com DMT2, selecionados na divisão de Endocrinologia do Departamento de Medicina da UNIFESP. Os pacientes selecionados estarão em acompanhamento médico com níveis de HbA1c controlados através de medicação e/ou dieta. Após seleção na UNIFESP, a amostra do estudo será encaminhada para a FOU SP para triagem e tratamento periodontal. A triagem selecionará indivíduos com DMT2 e periodontite crônica generalizada. Serão incluídos com pelo menos 30 anos de idade, diagnosticados com DMT2 e que apresentem sinais de periodontite crônica generalizada. Será realizada anamnese exame clínico periodontal. Os pacientes serão divididos aleatoriamente em dois grupos: o primeiro grupo- periodontal intensiva (TPI)- os pacientes receberão tratamento periodontal intensivo (raspagem e alisamento radicular). O segundo grupo, grupo controle receberão TPS (raspagem supragengival e polimento com uma única consulta). Serão avaliados após 2,4,6 e 12 meses. Qualquer indivíduo que apresente sinais de progressão da periodontite será excluído do estudo e encaminhado para terapia periodontal de raspagem subgengival. Serão verificados: sinais vitais e condições da diabetes mellitus, e análises laboratoriais de glicemia e níveis plasmáticos de TNF-alfa. Serão coletadas amostras de biofilme subgengival para determinação de patógenos por PCR quantitativo..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Ainda não está bem estabelecido na literatura os mecanismos inflamatórios que associam as doenças periodontais e o diabetes mellitus tipo 2. Este estudo visa avaliar o impacto da terapia periodontal no controle glicêmico de pacientes portadores de DMT2..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo, apresentando carta de aprovação do CEP da FOU SP.

TCLE: Apresentado adequadamente.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

1

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 6000,00.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 25/6/2012 e 25/6/2013.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0629/11

RECOMENDAÇÃO DO CEP: ENCAMINHAR APROVAÇÃO FAPESP ASSIM QUE FOR OBTIDA

Anexo C - Amplificação da curva padrão e curva de Melting das bactérias analisadas e do Universal

Porphyromonas gingivalis

curva padrão

curva de Melting

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

curva padrão

curva de Melting

Universal

curva padrão

curva de Melting

Tannerella forsythia

curva padrão

curva de Melting

Treponema denticola

curva padrão

curva de Melting