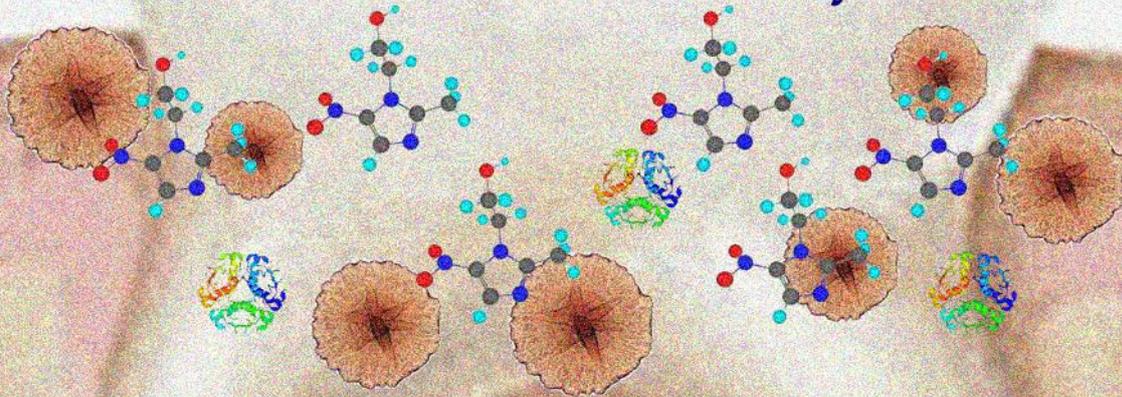


FOD USP

*Detecção precoce de bactérias periodontopatogênicas
e a ação de um gel de metronidazol 25% em crianças
com Diabetes mellitus tipo I*

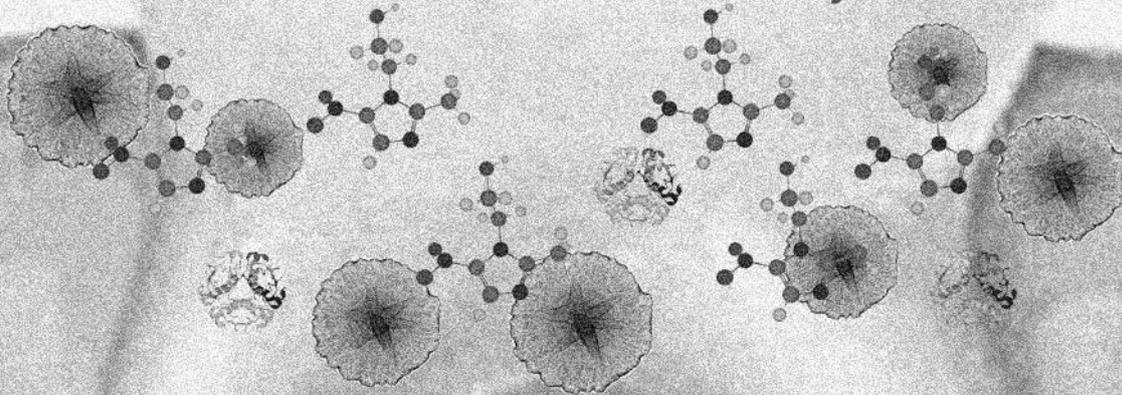


MARCELO PIRES PRESTES

BAURU
2007

FACEB USP

*Detecção precoce de bactérias periodontopatogênicas
e a ação de um gel de metronidazol 25% em crianças
com Diabetes mellitus tipo I*



MARCELO PIRES PRESTES

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Odontologia

Área de concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

BAURU
2007

Prestes, Marcelo Pires

P926d Detecção precoce de bactérias periodontopatogênicas e a ação de um gel de metronidazol 25% em crianças com Diabetes mellitus tipo I. / Marcelo Pires Prestes. - Bauru, 2007.

172 p.; il.; 30 cm.

Tese. (Doutorado)-Faculdade de Odontologia de Bauru/USP.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Ap. Andrade Moreira Machado

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor: _____

Data: ____ / ____ / ____

Comitê de Ética da FOB-USP

Processo nº: 06/2005

Data: 2 de maio de 2005.

Dados Curriculares

Marcelo Pires Prestes

Nascimento	30 de abril de 1969
Naturalidade	Sorocaba – SP
Filiação	Benedito Generozo Prestes Neto Marly Pires Prestes
1987 – 1991	Graduação em Odontologia – Universidade Estadual de Londrina (UEL)
1992 – 1995	Professor auxiliar do Departamento de Anatomia da Universidade Estadual de Londrina (UEL)
1996 – 1998	Especialização em Dentística Operatória – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC/USP)
1998 – 2000	Especialização em Odontopediatria – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC/USP)
2001 – 2003	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de mestrado pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo - USP
2003 – 2007	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de doutorado pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo - USP
Associações	SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

*Se eu ainda soubesse como mudar o mundo
Se eu ainda pudesse saber um pouco de tudo*

Eu voltaria atrás do tempo...

... Pra voltar pra ontem sem temer o futuro

E olhar pra hoje cheio de orgulho

Eu voltaria atrás do tempo...

Os nossos erros seriam apagados

Os nossos desejos ressuscitados

E de novo eu voltaria no tempo...

Maurício Barros e Guto Goffi (Barão Vermelho)

Dedico este trabalho...

Deus, quando você colocou a Simone na minha frente, nunca poderia imaginar o quão longe iríamos. Ao me presentear com a Amandinha, finalmente descobri o motivo pelo qual vim ao mundo; amar uma pequenina de uma forma tão intensa que talvez nunca consiga descrever. Isto tudo somente foi possível porque um dia o “seu” Dico e a “dona” Marly resolveram que eu deveria passar a existir, junto com o Márcio e a Milena. Assim criou-se uma família que me educou, ensinou a ser gente e me permitiu um dia constituir minhas próprias raízes. Portanto, este trabalho é para todos vocês. Em especial à Simone e a Amanda. Foi difícil, muito difícil, sei que sacrifiquei muito a vida de vocês. Deixei muitas responsabilidades minhas para você minha querida Simone, perdi momentos lindos ao seu lado minha amada filha; espero que possam entender esta minha sandice de querer a todo custo este doutorado e me perdoar por fazer de suas vidas uma loucura, mas sem o apoio da duas eu nunca teria chegado até aqui, amo muito vocês...

Agradecimentos Especiais

Prof^a Cidinha, durante nossa convivência aprendi coisas que me serão úteis para o resto da minha vida. E não aprendi somente em relação à vida acadêmica. Seu dinamismo, sua forma de tratar assuntos delicados e, principalmente, seu empreendedorismo estarão sempre guiando minhas ações. Você bem sabe que nunca fui muito bom com as palavras. Assim, tentei com a minha dedicação e lealdade agradecer a confiança que sempre depositou em mim; procurei sempre lembrar daquela história de “não pertencer a dois senhores”. Embora no primeiro momento você não tenha acreditado, a Odontopediatria transformou-se em um carma na minha vida, tamanha é a satisfação que sinto quando estou exercendo-a, seja em sala de aula, seja em cima do mocho. Dessa forma, serei para sempre grato por ter me proporcionado a chance de concretizar um sonho que comecei a alimentar no último ano de graduação, quando mantive meu primeiro contato com as crianças que viriam a ser o foco da minha vida profissional. Abandonei toda uma preparação que cultivava desde o início da faculdade para tornar-me um especialista em cirurgia e passei a buscar o conhecimento na arte de tratar pequenos infantes. Um pouco depois, a Odontopediatria me completou ao apresentar-me ao universo do paciente portador de necessidades especiais, até então sem o status de uma especialidade e assim, dentre outros profissionais que se “arriscavam” a atendê-los, estava a figura do odontopediatra. Ensinar, transmitir um pouco das experiências vividas era outra

aspiração, um pouco pretensiosa, mas que me fazia sentir útil e chegava a me entorpecer de satisfação. Hoje tudo isto se tornou possível, não sei como será daqui para frente, qual caminho irei trilhar, porém, tudo que desejei até aqui você ajudou a transformar em realidade e, por isto, se você aceitar, terá minha amizade e reconhecimento sempre que precisar. Um abraço fraterno e que Deus lhe abençoe...

Ainda de forma especial, gostaria de agradecer todas as crianças que aceitaram, colaboraram e participaram ativamente deste estudo. Um grande beijo do “Tio Marcelo” à:

*Ana Laura, Matheus, Gabriel, Paulinho, Mirelli, Giovana, Alan, Amanda, Raquel, Bárbara, Renata, Vinícius, Michelli, Mariana, Raphael, Rute, Luan, Eduardo, Marina, Luiza, Tamiris, Diego, Helder, Yara, Milena, Guilherme G., Amandinha, Guilherme B., Carolina, Leticia, Pedrinho e Bia; e um agradecimento particularmente especial para a **FERNANDA**, que nos deixou no meio do estudo para ir brincar com os anjos.*

Meus amiguinhos a presença de todos vocês foi decisiva, a colaboração foi maravilhosa e a amizade e os momentos descontraídos que proporcionaram fizeram todas as dificuldades virarem uma “brincadeira de criança”.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa dos vários diretores que tive a oportunidade de conhecer ao longo destes 10 anos que estou em Bauru, muito obrigado por proporcionar a realização dos meus sonhos.

Ao Professor Dr. Carlos Ferreira dos Santos pela co-orientação deste trabalho e por abrir as portas de seu laboratório, onde foi possível dar os primeiros passos deste trabalho.

À Associação dos Diabéticos de Bauru, na figura de seus dirigentes, funcionários e colaboradores, particularmente à Assistente Social Odaléa, que tudo fizeram para que este trabalho se concretizasse.

Aos professores do Departamento de Odontopediatria da FOB-USP, Dr. Aymar Pavarini, Dr. Bernardo Gonzalez Vono, Dr^a. Maria Francisca Thereza Borro Bijella, Dr. Ruy César Camargo Abdo, Dr. José Eduardo de Oliveira Lima e Dr^a. Salete Moura Bonifácio da Silva, por fazerem da Odontopediatria uma segunda religião e, através de seus atos, nos mostrarem a sua importância.

Ao Thiago Dionísio, o “Zezinho”, que há muito deixou de ser técnico de laboratório para exercer outra profissão, a de anjo da guarda. E, dia-após-dia, carrega debaixo de suas asas boa parte dos pós-graduandos que chegam ao departamento, assim como eu, completamente confuso. Meu amigo, me permita chamá-lo assim, um dia um colega em comum disse que você seria “o maior cientista que o mundo já viu”, estou começando a acreditar nele, continue firme em suas convicções. Um grande abraço e obrigado por tudo.

Agora aos amigos Dr. Aymar Pavarini, Dr. Ruy César Camargo Abdo e Dr. José Eduardo de Oliveira Lima, nossas conversas sempre regadas a iguarias gastronômicas me instruíram muito sobre a profissão e a vida. Dr. Aymar,

sempre admirei sua forma ética e gentil de fazer suas ponderações e emitir suas opiniões, gostaria muito de ser como o senhor “quando crescer”. Dr. Ruy, sua franqueza é contagiante, me fez enxergar que é hora de “arregaçar as mangas” e virar um dentista de verdade. Dr. José Eduardo, talvez seu maior legado para mim foi me fazer entender que, todos os títulos que conquistei de nada valerão se minha família não vier em primeiro plano. Espero poder continuar a desfrutar da amizade e dos princípios de todos vocês.

Professora Salete, quando conversávamos ao final das clínicas, principalmente sobre pacientes especiais, sempre eu encerrava esta conversa com a sensação de querer mais. Gostaria de ter experimentado a chance de absorver mais ensinamentos seus, mesmo assim serei eternamente grato pelo tanto que me proporcionou.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria da FOB-USP, Fátima, Lia, Lílian, Maria Estela, Márcia e todos os que passaram pelo departamento ao longo destes anos que estive com vocês. Em particular à Fátima por sempre me atender gentilmente com um sorriso quando precisei e à Lílian por me dar segurança ao atender nossos pacientes mais difíceis e *especiais*. Maria Estela estou torcendo por você.

Aos amigos do “mestrado antigo”, Giovana (endo), Diego (Carioca), Leonardo (Mineiro), Rodrigo (Fodão), Rogério (Alf), Everdan (endo), Sheila (odontop) e Glória (paraguaia), e tantos outros que aqui não caberiam; sinto saudades do nosso início de curso e, principalmente, de vocês.

Aos colegas de Pós-Graduação Adriano, Marina, Gládis, Érika, Leandra, Heitor, Thaís, Rogério, Glória, Andréa, Sheila, Dani, Lili, Vivi, Ana Paula, Dafna, Thiago, Evaristo, Vivien, Tiza, Carol Magalhães e Juliano. Agradeço estes anos de convívio, terei muitas lembranças de todos.

Ao Adriano, ao qual a Amandinha desde pequena aprendeu a chamar de “Tio Japonês”. Faz tempo que nos conhecemos e nestes últimos anos foi possível descobrir ainda mais qualidades em você. Fiquei muito feliz por estar presente

em uma das fases mais lindas de sua vida e presenciar o nascimento de sua jóia mais rara. Adriano, gostaria de um dia ter ao menos um pouquinho desta bondade que você tem em seu coração. Um forte abraço pra você, Suzana, Letícia e toda a família Hoshi que é maravilhosa.

Marina e Gládis, bem sei que não tenho idade para ser filho de vocês, talvez um irmão um pouco mais novo, mas como vocês sempre me trataram com um carinho maternal, inclusive me puxando a orelha na hora certa, evitando que meu temperamento colocasse tudo a perder. Peço licença para dizer que as duas foram como uma mãe para mim durante o tempo em que estivemos juntos, espero sempre poder contar com a amizade de vocês.

À Vivien que, no início desta caminhada, teve a boa vontade de partilhar parte de seu conhecimento e me guiar nas primeiras etapas deste estudo.

Agradeço também todos os funcionários da FOB – USP que de maneira direta ou indireta contribuíram para minha formação acadêmica e como ser humano. Anonimamente muitos de vocês deixaram ensinamentos que certamente enriqueceram meu caráter.

Ao colega pós-graduando Rafael Nóbrega Stipp e ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, ambos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicada/UNICAMP, pela gentileza de ceder as cepas puras de *A. actinomycetemcomitans* utilizadas na confecção da curva padrão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, por transformar-se em uma “luz no fim do túnel” quando achei que meu trabalho estava perdido.

Ao amigo e colega de Pós-Graduação Eduardo Bresciani, pela inestimável colaboração na formatação deste trabalho.

À Rose, que nestes anos vem criando minha filha permitindo assim que eu continue neste meu desatino para conseguir este meu sonhado e suado título.

A todos que involuntariamente, na ânsia de finalizar este trabalho, possa ter deixado de mencionar nestes agradecimentos, mas de alguma forma cruzaram meu caminho durante todo o tempo em que estive vivendo na comunidade FOB – USP, e que colaboraram para que eu pudesse vir a ser alguém melhor neste mundo. Deus abençoe todos vocês, deixo um forte abraço a todos e espero encontrá-los novamente algum dia. Obrigado, obrigado, obrigado...

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	
LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	
RESUMO.....	
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1 <i>Diabetes mellitus</i>	9
2.2 <i>Diabetes mellitus e doença periodontal</i>	14
2.3 <i>Periodontopatógenos</i>	27
2.4 <i>Metronidazol</i>	46
2.5 <i>Real-Time PCR</i>	72
2.6 <i>Saliva como fonte de bactérias</i>	79
3. PROPOSIÇÃO.....	89
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	93
4.1 <i>Seleção dos pacientes e coleta das amostras</i>	93
4.2 <i>Extração do DNA bacteriano das amostras de saliva</i>	95
4.3 <i>Real-Time PCR</i>	95
5. RESULTADOS.....	101
5.1 <i>Resultados clínicos</i>	101
5.1.1 <i>Índice gengival</i>	102
5.1.2 <i>Índice de placa</i>	104
5.1.3 <i>Profundidade de sondagem</i>	106
5.2 <i>Resultados microbiológicos</i>	109
6. DISCUSSÃO.....	121
7. CONCLUSÕES.....	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
APÊNDICES.....	161
ANEXOS.....	167
ABSTRACT.....	171

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	Índice gengival em 1 ano de avaliação (escore 0-3), para os grupos D e ND.....	102
Figura 2	Índice de placa em 1 ano de avaliação (escore 0-3), para os grupos D e ND.....	104
Figura 3	Profundidade de sondagem em 1 ano de avaliação (em mm), para os grupos D e ND.....	106
Figura 4	Painel superior: número de UFC de <i>A. actinomycetemcomitans</i> em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (média dos indivíduos positivos para <i>Aa</i>).....	111
Figura 5	Painel superior: número de UFC de <i>A. actinomycetemcomitans</i> em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 3 do grupo diabético).....	112
Figura 6	Painel superior: número de UFC de <i>A. actinomycetemcomitans</i> em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 39 do grupo diabético).....	113
Figura 7	Painel superior: número de UFC de <i>A. actinomycetemcomitans</i> em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 13 do grupo não diabético).....	114
Figura 8	Painel superior: número de UFC de <i>A. actinomycetemcomitans</i> em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 19 do grupo não diabético).....	115

- Figura 9 Painel superior: número de UFC de *A. 116*
actinomycetemcomitans em 5 ng de DNA bacteriano. Painel
inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de
sondagem. (paciente 27 do grupo não diabético).....
- Figura 10 Painel superior: número de UFC de *A. 117*
actinomycetemcomitans em 5 ng de DNA bacteriano. Painel
inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de
sondagem. (paciente 35 do grupo não diabético).....

- QUADROS

QUADRO 1	ANOVA a 2 critérios (diferença entre grupos e fases) – IG.....	103
QUADRO 2	Teste de Tukey para comparação entre as fases de leitura - IG	103
QUADRO 3	ANOVA a 2 critérios (diferença entre grupos e fases) – IP.....	105
QUADRO 4	Teste de Tukey para comparação entre as fases de leitura - IP	105
QUADRO 5	ANOVA a 2 critérios (diferença entre grupos e fases) – PS.....	107
QUADRO 6	Teste de Tukey para comparação entre as fases de leitura -PS	107
QUADRO 7	Teste de Tukey para comparação entre os grupos – PS.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do gel de metronidazol 25% (peso/peso).....	93
Tabela 2	Índice gengival ($\bar{x} \pm dp$) para ambos os grupos ao longo do estudo.....	102
Tabela 3	Índice de placa ($\bar{x} \pm dp$) para ambos os grupos ao longo do estudo.....	104
Tabela 4	Profundidade de sondagem ($\bar{x} \pm dp$) para ambos os grupos ao longo do estudo.....	106
Tabela 5	Indivíduos positivos para <i>A. actinomycetemcomitans</i> ($\bar{x} \pm dp$) – número de UFC em 5 ng de DNA bacteriano.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aa ou *A. actinomycetemcomitans* – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente chamado *Actinobacillus/Actinomyces actinomycetemcomitans*)

AGE – Produtos finais da glicação (glicosilação) ou proteínas glicadas (glicosiladas)

A. naeslundii - *Actinomyces naeslundii*

ATCC – American Type Culture Collection

T0 – Tempo zero, início do estudo antes da instituição da terapia

BMI – Indicador de massa corpórea (Body Mass Indicator)

B. gracilis – *Bacteroides gracilis*

B. forsythus – *Bacteroides forsythus*

C. ochracea – *Capnocytophaga ochracea*

ceod/s – superfícies ou dentes decíduos cariados, perdidos ou obturados

UFC – Unidade formadora de colônia

CPOD/S – superfícies ou dentes permanentes cariados, perdidos ou obturados

C. rectus – *Campylobacter rectus*

C. sputigena – *Capnocytophaga sputigena*

D – Grupo Diabético

DNA – Ácido desoxirribonucléico

E. corrodens – *Eikenella corrodens*

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISPOT – Enzyme-linked immunosorbent spot

F. nucleatum - *Fusobacterium nucleatum*

GCF – Fluido do sulco gengival

GJP – Periodontite juvenil generalizada

HbA₁ ou HbA_{1c} – Hemoglobina glicosilada

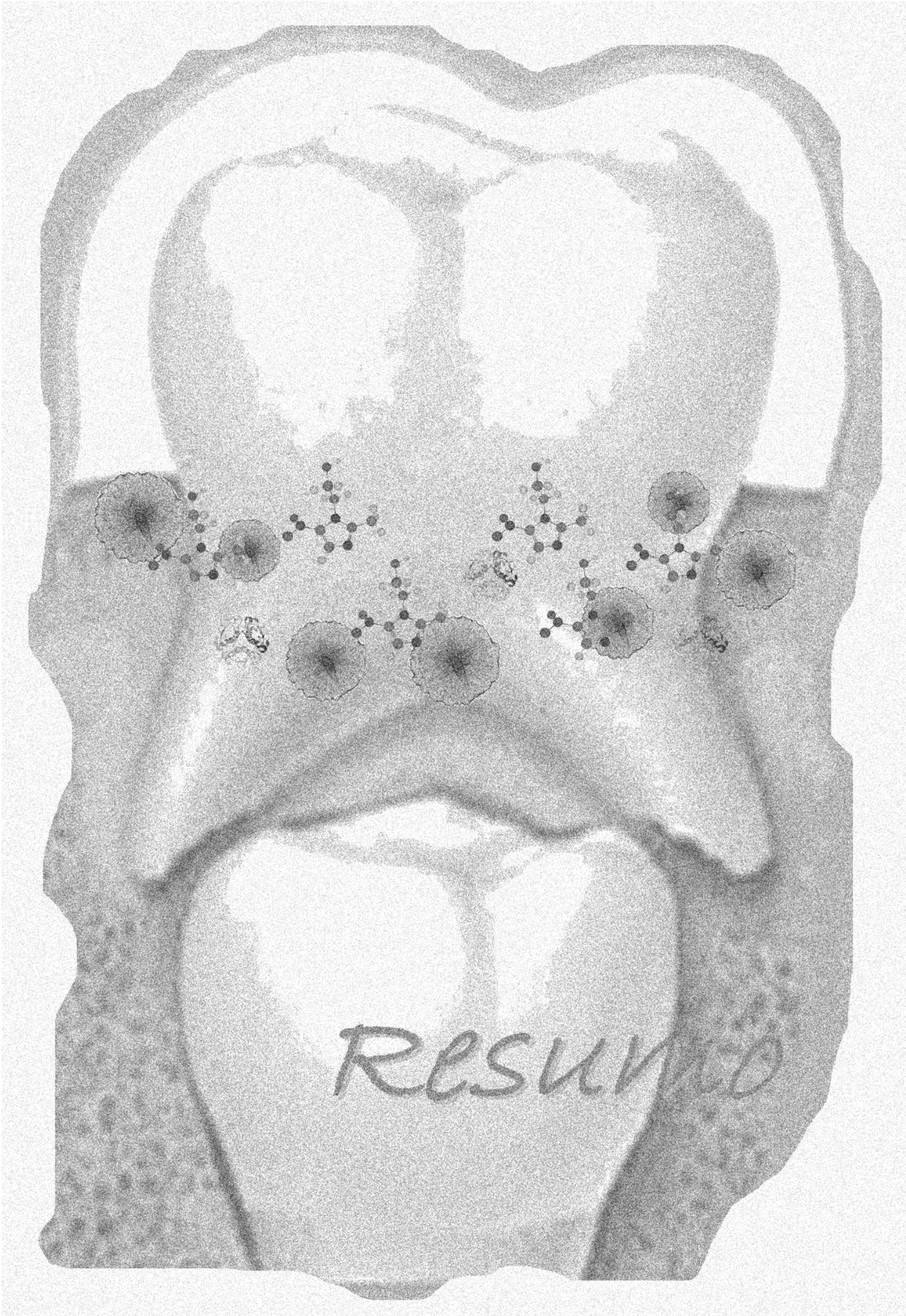
IDDM ou T1DM – Diabetes mellitus insulino-dependente ou diabetes mellitus tipo 1

IG – Índice gengival

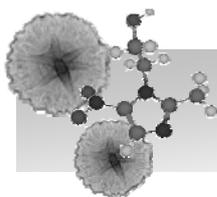
Ig – Imunoglobulina

IP – Índice de placa

IL – Interleucina
LPS – Lipopolissacarídeos
MIC50 – Mínima concentração inibitória requerida para inibir o crescimento de 50% dos microrganismos
mL – Mililitro
ND – Grupo não diabético
OR – Odds ratio
p – Nível de significância
pb – Pares de base
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PDL – Células do ligamento periodontal
PGE – Prostaglandina E
P. gingivalis – Porphyromonas gingivalis ou Bacteroides gingivalis
P. intermedia – Prevotella intermedia ou Prevotella intermedius ou Bacteroides intermedius
PJL ou LPJ – Periodontite juvenil localizada
P. melaninogenica – Prevotella melaninogenica
P. micros – Peptostreptococcus micros
P. nigrescens – Prevotella nigrescens
PS – Profundidade de sondagem
Real-Time PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA – Ácido ribonucléico
RT-PCR – Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
T2DM – Diabetes mellitus tipo 2
T. denticola – Treponema denticola
T. forsythensis – Tannerella forsythensis
TNF-alfa ou TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TSBV – Agar soja tripticaseína acrescido de bacitracina e vancomicina
V. parvula – Veillonella parvula
 \bar{x} – Média
 μg – Micrograma
 μL – Microlitro
 μM – Micromolar
 μm – Micrometro



RESUMMO

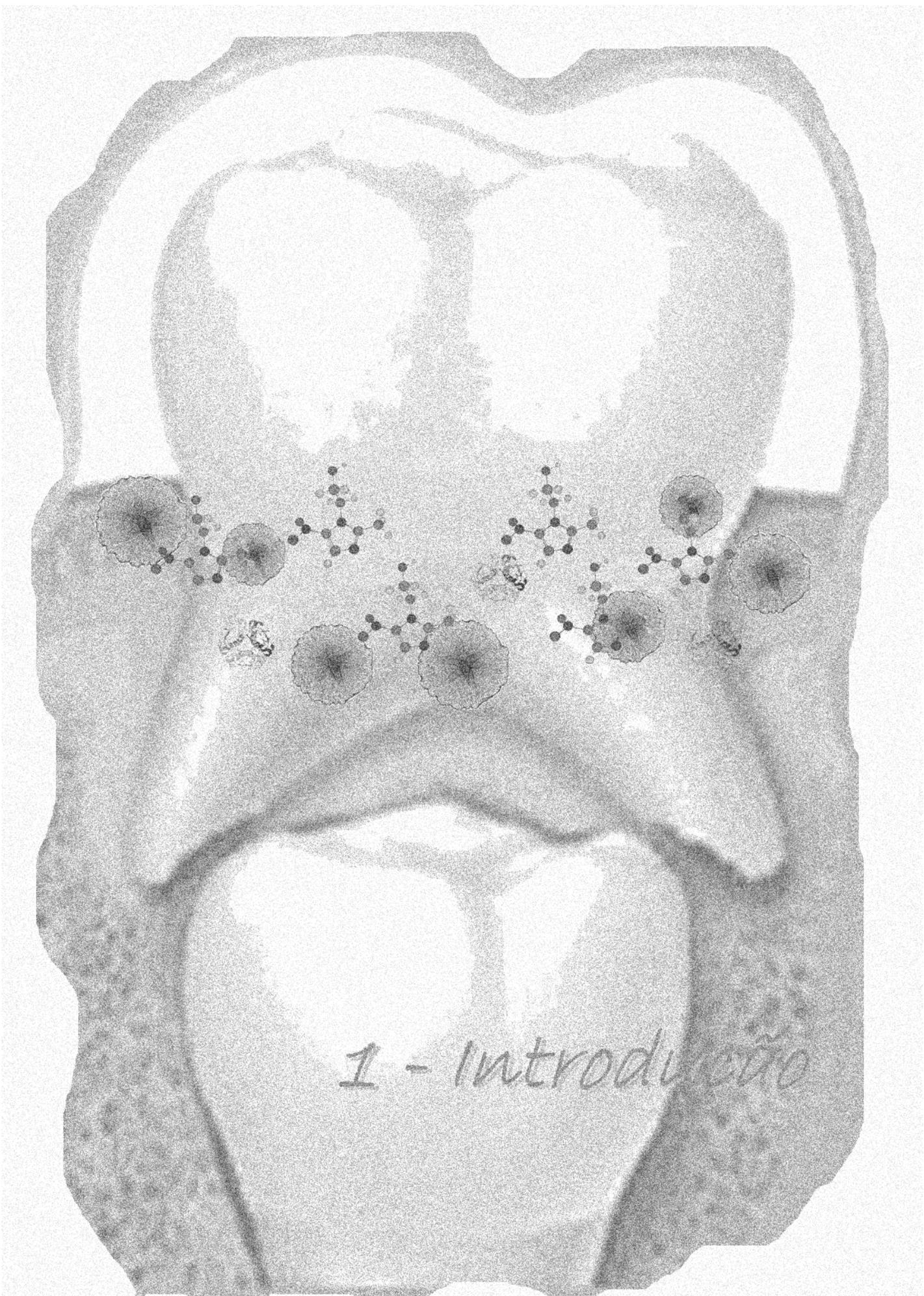


RESUMO

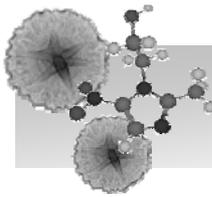
A Diabetes mellitus do tipo I (IDDM), doença metabólica caracterizada pela deficiência na produção de insulina, causa profundas alterações sistêmicas, incluindo a cavidade bucal. A doença periodontal, que se apresenta mais agressiva em pacientes diabéticos, até mesmo na infância, tem como agentes etiológicos microrganismos denominados periodontopatógenos, dentre eles o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), anteriormente chamado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que em associação às alterações na resposta imune e inflamatória decorrentes da diabetes, poderá causar maior reabsorção do osso alveolar precocemente em crianças. A identificação precoce destes agressores poderá ser extremamente útil para a instituição de medidas preventivas e terapêuticas que possam inibir ou minimizar os efeitos nocivos da IDDM e suas conseqüências para a cavidade bucal. Para este fim, métodos moleculares de investigação estão sendo cada vez mais utilizados, destacando-se a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real-Time PCR) com alta especificidade e sensibilidade para detectar e quantificar microrganismos, mesmo em pequeno número e em meios, até então, pouco explorados como a saliva. Por fim, a utilização de um antimicrobiano seguro, que possa ser aplicado topicamente por meio da escovação dentária, como o metronidazol 25% na forma de gel, poderia reduzir ou eliminar o *A. actinomycetemcomitans* evitando a progressão da doença periodontal. Assim, este estudo foi realizado para observar a presença do *A. actinomycetemcomitans* antes e após o uso do gel de metronidazol 25% uma vez ao dia, em substituição a uma das escovações diárias. Avaliou também a influência deste protocolo de tratamento nos índices de placa, gengival e profundidade de sondagem em 32 crianças, na faixa etária de 3 a 12 anos de idade, divididas em dois grupos: diabéticos tipo I (D) e não diabéticos (ND). Para avaliação da presença do *A. actinomycetemcomitans* foi utilizado o método da Real-Time PCR. Os resultados obtidos sugerem que o

gel de metronidazol 25%, aplicado segundo o protocolo estabelecido neste trabalho foi efetivo para a redução dos índices de placa, gengival e do *A. actinomycetemcomitans*, no entanto, pareceu não atuar sobre a profundidade de sondagem. Os dados obtidos sugerem que, ainda que a ocorrência da bactéria nos indivíduos avaliados tenha sido baixa e a diferença entre o grupo diabéticos e não diabéticos tenha restringido-se apenas à profundidade de sondagem, o gel estudado demonstrou ser promissor na prevenção da doença periodontal em crianças diabéticas, havendo necessidade da realização de mais estudos clínicos randomizados.

Palavras-chave:- *Diabetes mellitus, Doenças da gengiva, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Metronidazol, Reação em cadeia da polimerase.*

The image shows a decorative page with a scalloped border. In the center, there is a faint illustration of a person's face, possibly a woman, with dark hair. Below the face, there is a decorative floral pattern consisting of several dark, circular flowers arranged in a row. The page is otherwise blank, with the text '1 - Introducción' written in the lower right corner.

1 - Introducción



1 - INTRODUÇÃO

Os tecidos gengivais saudáveis normalmente têm coloração rosa pálida, sua superfície tem aspecto granuloso e tônico consistente. Entretanto, em algumas situações este quadro pode apresentar-se alterado, mesmo em crianças bem jovens. A natureza insidiosa da doença periodontal é indicada pela ocorrência documentada de inflamação gengival branda nas crianças, aumentando de gravidade em adolescentes e adultos jovens, e a freqüente progressão para a perda parcial ou completa dos dentes na meia idade ou mais tarde⁶⁸. Assim, a concepção de que a doença periodontal manifesta-se apenas no adulto já está ultrapassada, obrigando-nos à necessidade de prevenir, diagnosticá-la e tratá-la na infância e adolescência¹²².

A doença periodontal, que tem como um dos fatores etiológicos a placa dentária, é uma doença inflamatória da gengiva e dos tecidos periodontais mais profundos, caracteriza-se pela formação de bolsa e destruição do osso alveolar de suporte. Alguns autores⁶⁸ acreditam que há quatro variedades diferentes de periodontite: da pré-puberdade, juvenil, de progressão rápida e adulta. A periodontite pré-puberal da dentição decídua é a princípio localizada, porém, pode ocorrer de forma generalizada e seu início ocorre durante ou logo após a erupção dos dentes decíduos. Inicialmente, o tecido gengival revela apenas inflamação reduzida e a quantidade de placa é mínima. Com a evolução, a destruição do osso alveolar é rápida e os dentes decíduos podem ser perdidos por volta dos 3 anos de idade. Ainda que a patogênese da doença não seja bem estabelecida, sabe-se que alguns dos microrganismos predominantes nestas bolsas gengivais são, geralmente, o *A. actinomycetemcomitans* e a *P. gingivalis*, entre outros^{68, 122}.

Ainda que não existam muitas evidências de que as condições sistêmicas constituam fatores primários na etiologia da doença periodontal, estas contribuem para a alteração da saúde periodontal como, por exemplo, na periodontite pré-puberal, que pode afetar alguns ou muitos dentes, iniciando-se

precocemente como uma inflamação gengival pequena ou inexistente e evoluindo para uma grande destruição do osso alveolar¹²². Além disso, em indivíduos diabéticos, também nota-se maior sangramento gengival, profundidade de sondagem, perda de inserção, perda óssea e prevalência mais acentuada da periodontite avançada³². Dessa forma, a doença periodontal severa, freqüentemente coexiste com diabetes mellitus severa, pois a diabetes é um fator de risco para a doença periodontal³³.

A diabetes tipo I ou insulino-dependente (IDDM) é a forma mais comum desta doença em crianças. Aproximadamente 2 em 1000 crianças entre idades de 5 a 18 anos têm a doença¹¹². No Brasil, a incidência do IDDM foi avaliada em três cidades no Estado de São Paulo (Bauru, Botucatu, Rio Claro), revelando que a incidência anual em crianças de 0 a 14 anos de idade é de 7,6/100.000 habitantes²², valores bem próximos daqueles encontrados na Itália, França, Polônia e Canadá^{17, 108}.

Assim, considerando que esta manifestação sistêmica poderá agravar a doença periodontal, poderemos utilizar alguns agentes antimicrobianos, como auxiliares no combate ou prevenção dos patógenos encontrados nas doenças periodontais. Este expediente e seus métodos de aplicação (enxagatórios orais, dentifrícios, aplicação tópica ou administração sistêmica) devem ser selecionados levando em consideração que devem ser eficientes contra os microrganismos presentes, alcançar o local desejado de ação em uma concentração apropriada, e permanecer nele por um período suficiente de tempo. Quando combinado com uma avaliação cuidadosa do paciente e um diagnóstico ponderado, o uso destes quimioterápicos poderá ser um suplemento importante na terapia periodontal³⁷.

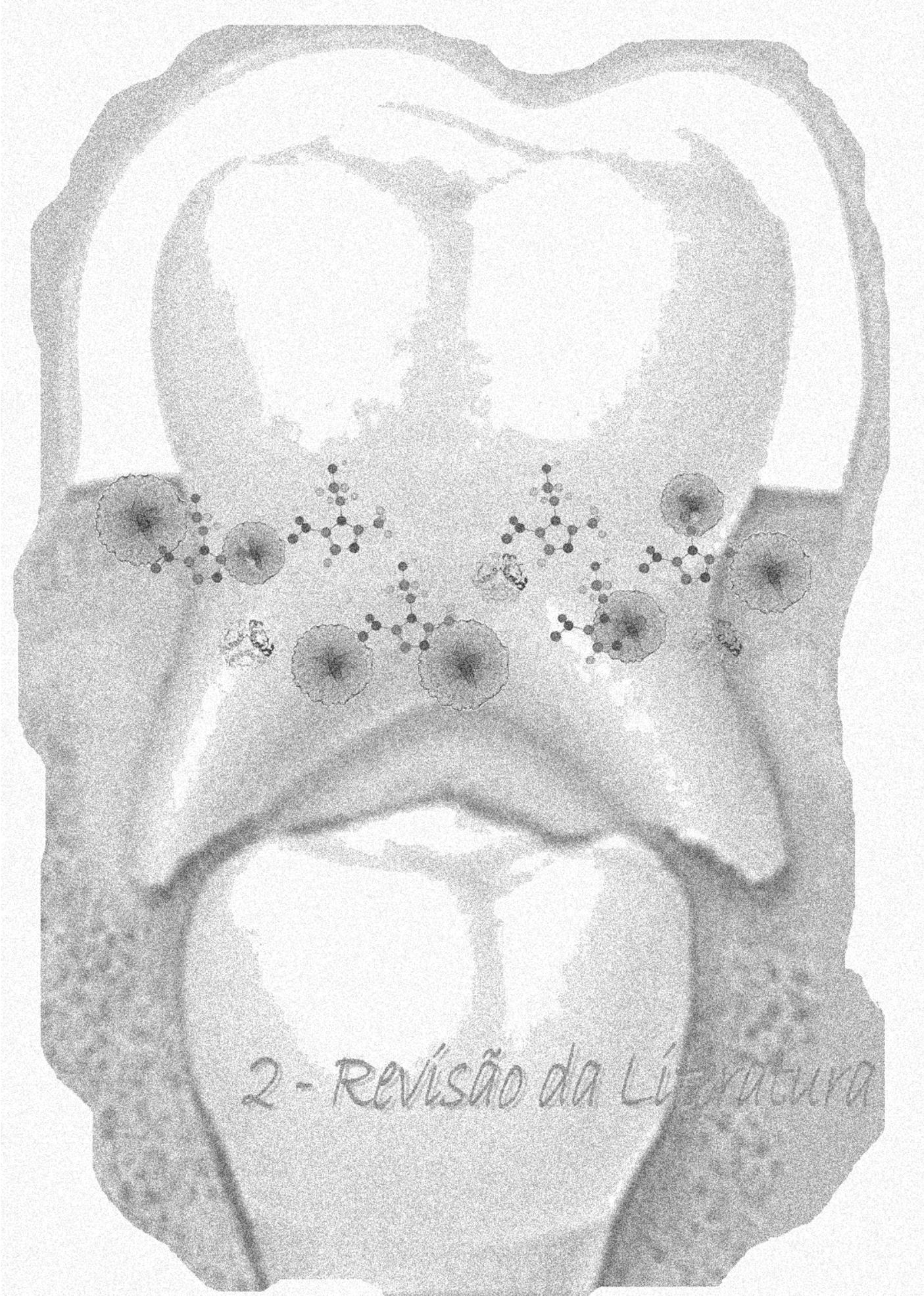
Em algumas situações, o uso de antibioticoterapia preventiva se explica em função de que, na cavidade bucal, microrganismos oportunistas podem encontrar encontram condições de patogenicidade. A ocorrência de xerostomia, por exemplo, ou simplesmente a diminuição do fluxo salivar, comum na diabetes, leva à perda da função protetora da saliva que pode ser agravada pela queda da resistência orgânica, também presente nesta patologia²⁵. Posto isto, uma das abordagens terapêuticas é aplicar drogas antimicrobianas localmente ao tecido gengival afetado com ou sem o debridamento mecânico, e dentre os medicamentos utilizados mais

recentemente, destaca-se o metronidazol em gel 25%^{1, 3, 5, 7, 15, 26, 34, 35, 51, 82, 85, 94, 96, 114, 115, 116}.

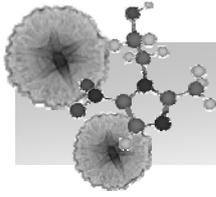
Além das condições sistêmicas e da resposta do hospedeiro, outros fatores de risco também estarão diretamente relacionadas à colonização bacteriana deste indivíduo. Assim, segundo SAKAI⁹⁹, 2002, a identificação desta colonização poderá oferecer subsídios para a anulação destes riscos, bem como a identificação de determinantes moleculares da patogênese da periodontite corresponderia a uma promessa significativa para o diagnóstico e tratamento, a determinação do prognóstico e as necessidades terapêuticas.

Por fim, as técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) e outras tecnologias moleculares, têm sido cada vez mais utilizadas nas pesquisas odontológicas como ferramentas auxiliares para nortear não só o diagnóstico, mas também o tratamento e prevenção de várias doenças. Entre elas a doença periodontal, uma vez que se mostram vantajosas em comparação a outras técnicas tradicionais pela sua alta especialidade, alta sensibilidade e rapidez⁹⁹. Em adição, a saliva apresenta-se com um alto potencial como fonte de DNA bacteriano, servindo de indicador da doença atual e risco futuro desta. Por ser mais facilmente disponível nos indivíduos, sua coleta implica em um método pouco invasivo, podendo ser facilmente obtida, inclusive em crianças^{99, 100}. Dessa forma, poderá substituir o sangue e a placa dentária em muitas análises⁷², inclusive para o estudo da comunidade bacteriana oral, onde parece ser a amostra mais adequada uma vez que contém uma amostra significativa da variedade de bactérias dos diferentes sítios orais⁷⁸.

Assim sendo, neste estudo aplicou-se um protocolo de uso de um gel de metronidazol 25% em substituição a uma escovação diária, durante 14 dias, em 32 crianças, na faixa etária de 3 a 12 anos de idade, divididas em dois grupos - diabéticos do tipo I (D) e não diabéticos (ND). Estas foram acompanhadas por 1 ano, e avaliados por meio de suas amostras de saliva, pelo método da Real-Time PCR para a presença e quantidade de *A. actinomycetemcomitans*, e por índices de placa, gengival e profundidade de sondagem.



2 - Revisão da Literatura



2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus

A diabetes tipo I é percebida como uma doença crônica auto-imune com sinais iniciais prodrômicos subclínicos caracterizados por uma perda seletiva de insulina produzida pelas células beta das ilhotas pancreáticas em indivíduos geneticamente predispostos. Menos de 10% destes com aumentada susceptibilidade genética progride para a doença sugerindo uma forte relação com modificações ambientais do processo pré-diabético. Vários iniciadores exógenos, tais como certos fatores dietéticos e viróticos, acredita-se induzir o processo auto-imune levando, em alguns indivíduos, à destruição extensa de células beta e, por fim, à manifestação clínica de diabetes tipo I. Em adição ao seu papel de desencadeador da doença, os fatores relativos ao meio também provavelmente afetam o resultado do processo e a taxa de progressão da doença clínica em indivíduos que desenvolvem diabetes tipo I. Nesta revisão de KNIP; AKERBLOM⁵⁰, 1999, são focados dados relacionados a fatores ambientais que potencialmente envolvem a patogênese da diabetes tipo I, com ênfase em fatores dietéticos, e as proteínas do leite bovino (CM) em particular. A hipótese CM tem permanecido controversa por décadas e, conseqüentemente, uma pesquisa deveria ser realizada para esclarecer o assunto. Estudos prospectivos recentes têm indicado que infecções enterovirais podem induzir auto-imunidade às células beta e potencializar a resposta imune humoral aos antígenos contra células beta em indivíduos com um processo avançado. Também há alguns dados preliminares sugerindo um papel semelhante para infecções por rotavírus. Embora possa haver um iniciador único para auto-imunidade contra células beta em certos indivíduos, é extremamente improvável que haja somente um fator exógeno determinante da diabetes tipo I. Mais propriamente nós teríamos uma complicada interação entre uma série de fatores ambientais e, entre fatores ambientais e

componentes genéticos da doença, resultando em uma progressão clínica da diabetes tipo I em indivíduos geneticamente susceptíveis, os quais experimentam uma infeliz combinação e/ou agrupamento de elementos exógenos diabetogênicos responsáveis, e/ou associados a uma falta de modificadores ambientais de proteção. Finalizam reconhecendo que estudos prospectivos mais avançados, começando a partir do nascimento, forneceriam um melhor panorama para a identificação de fatores ambientais que afetariam o risco de desenvolvimento da diabetes tipo I em sua forma clínica.

Para AKERBLOM et al.², 2002, a diabetes tipo I é considerada uma doença auto-imune, na qual infiltrados de linfócitos T nas ilhotas do pâncreas destroem a população de células beta produtoras de insulina. Além da especificidade antigênica, a qualidade da reação imune contra as células das ilhotas é um determinante de importância na destruição destas. Mais evidências indicam que a função do sistema imune visceral é essencial na patogênese da doença, assim como a regulação deste sistema imune pode ser anormal na diabetes tipo I. O papel de infecções viróticas na patogênese da diabetes tipo I tem sido suportado por substanciais evidências sugerindo que um grupo de vírus, enterovírus, pode iniciar o processo de destruição das células beta em um número considerável de pacientes. As últimas evidências vêm de estudos indicando a presença de genoma viral em pacientes diabéticos e de estudos prospectivos confirmando o risco epidemiológico deste efeito. Se esta associação ainda permanece verdadeira em estudos avançados de larga escala, mais pesquisas devem ser consideradas para confirmar esta relação de causa-efeito. Dos fatores dietéticos etiológicos presumidos, as proteínas do leite de vaca têm recebido a principal atenção. Vários estudos indicam uma associação entre a exposição precoce às proteínas do leite bovino e um risco aumentado à diabetes tipo I. Esta questão poderia ser elucidada por uma intervenção avaliativa em larga escala, prospectiva, aleatorizada e internacional. Outro aspecto da dieta que necessita de mais estudos é a deficiência de vitamina D. Entre as toxinas, componentes N-nitrosos são os principais candidatos. Desta forma, os autores sugerem que uma interação de fatores genéticos e ambientais é importante na avaliação da

possível responsabilidade de certos fatores ambientais na etiologia da diabetes tipo I.

KIBIRIGE et al.⁴⁵, 2003, analisando trabalhos anteriores, observou que estes atribuíam maior risco de diabetes tipo I entre as pessoas que apresentavam-se com mais peso na infância. Segundo estes autores, a “Hipótese Aceleradora” prediz início precoce em indivíduos obesos, sem necessariamente uma mudança no risco, e considera a diabetes tipo I e II como uma mesma desordem de resistência à insulina, contrariando diferentes conhecimentos genéticos. A resistência à insulina é devida à gordura e o aumento de peso, no mundo industrializado, e tem sido acompanhada pela apresentação precoce (aceleração) da diabetes tipo II. Com este estudo os autores desejam estabelecer se o aumento de peso também está associado com o início precoce da diabetes tipo I, como a “Hipótese Aceleradora” poderia presumir. Posto isto, avaliaram as relações entre obesidade e idade do diagnóstico da doença, no contexto de peso ao nascimento, mudanças de peso desde o nascimento, peso no momento do diagnóstico, BMI (Body Mass Indicator)* no diagnóstico e BMI 12 meses após, em 94 crianças entre 1 e 16 anos (49 meninos e 45 meninas) que se apresentaram para controle da diabetes tipo I de início agudo. Os resultados apresentados para os escores de desvio padrão (SDS) para o BMI no diagnóstico, SDS para mudança de peso após o nascimento e BMI SDS após 12 meses do diagnóstico estavam todos inversamente relacionados à idade quando da apresentação da referida doença ($r = -0,39$ a $-0,40$, $p < 0,001$). Os meninos estavam significativamente mais gordos que as meninas (BMI SDS 0,56 contra -0,08, respectivamente; $p = 0,006$) e apresentaram a diabetes, significativamente, mais cedo (6,74 contra 8,32 anos, respectivamente; $p < 0,05$). A diferença de sexo na idade do diagnóstico, entretanto, desapareceu quando corrigida para BMI ($p = 0,31$), sugerindo que a obesidade ou algo relacionado a ela foi o fator responsável pela diabetes. Concluem dessa forma que, os dados são consistentes com a

*BMI (indicador de massa corpórea) é um quociente derivado da fórmula $BMI = \text{peso kg}/(\text{altura cm})^2$ para determinar se o seu peso está adequado à sua altura, quando da avaliação de riscos à saúde.

hipótese de que a idade no início da diabetes tipo I está associada com a obesidade, sendo necessário cuidados preventivos importantes.

LIBMAN et al.⁵⁴, 2003, haviam previamente reportado diferenças na prevalência de auto-anticorpos contra células beta do pâncreas (AAs), em crianças negras e brancas com diabetes tipo I, sugerindo que a patogênese da doença poderia ser mais heterogênea entre grupos raciais do que havia se pensado. Para melhor explorar este assunto, compararam características clínicas, bioquímicas e auto-imunes no momento do diagnóstico e na seqüência do tratamento em um número extenso de crianças negras e brancas com e sem a presença de AAs. Em um estudo coorte (em grupos), 130 crianças e adolescentes negros e brancos, com idade acima de 19 anos, diagnosticados com diabetes e tratados com insulina desde o início do diagnóstico da doença (janeiro de 1979 a dezembro de 1998) foram pareados a um mesmo número de indivíduos brancos por idade de diagnóstico, sexo e ano do diagnóstico. Os resultados demonstraram que crianças negras apresentavam uma maior prevalência de obesidade (43 contra 11%) e *acanthosis nigricans* (21 contra 1%) comparadas às crianças brancas e uma menor prevalência de AAs. Quando comparadas às crianças negras que apresentavam AAs, as que não apresentavam AAs eram mais velhas e demonstravam-se com maior prevalência de obesidade, *acanthosis nigricans* e diabetes parenteral. Entretanto, um de cada quatro crianças negras com AAs estava obesa e/ou com *acanthosis nigricans*. Entre as crianças brancas, a falta de AAs não estava associada a qualquer diferença relacionada à obesidade ou *acanthosis nigricans* quando comparadas àquelas com AAs. Semelhante aos seus pares negros, crianças brancas sem anticorpos eram mais velhas e com uma maior prevalência de diabetes parenteral. Embora o uso de um sensibilizador de insulina durante o tratamento, a terapia raramente era descontinuada ou interrompida. Para os autores estes indivíduos pediátricos, sem considerar a auto-imunidade, frequentemente demonstraram características associadas à diabetes tipo II. Estas características estavam mais usualmente demonstradas em crianças negras. E concluem aludindo que os dados sugerem que a diabetes da infância pode constituir um espectro de mecanismos patogênicos que podem se sobrepor, incluindo aqueles

tipicamente associados com ambos os tipos I e II de diabetes, sendo que estes achados podem ter implicações terapêuticas.

O objetivo do estudo de LIBMAN et al.⁵⁵, 2003, foi comparar a prevalência de obesidade, em adolescentes e crianças negras e brancas, ao início da diabetes insulino-dependente durante dois períodos (1979-1989 – período I, e 1990-1998 – período II). Todas as crianças negras menores de 19 anos, diagnosticadas para diabetes e tratadas com insulina desde o início, admitidas pelo Hospital Infantil de Pittsburgh entre janeiro de 1979 e dezembro de 1998 foram pareadas com crianças brancas por sexo, idade do diagnóstico e ano do diagnóstico. Os dados foram obtidos a partir de registros médicos. A obesidade foi definida como BMI \geq ao percentil 85^o para idade e sexo. Também foram mensurados os auto-anticorpos para as células das ilhotas do pâncreas. A prevalência da presença de obesidade aumentou de 12,6% (período I) para 36,8% (período II) ($p = 0,0003$); em brancos de 2,9 a 16,6 % ($p = 0,04$) e em negros de 22 a 55 % ($p = 0,001$); em faixa etária menor que 11 anos de 7,3 a 22,2 % ($p = 0,04$) e entre 11 e 18 anos de 20 a 50 % ($p = 0,006$). Em criança com pelo menos um anticorpo, a prevalência de obesidade aumentou de 5,1 para 24,4 % ($p = 0,001$). Pela análise de regressão logística multivariada; o período de diagnóstico (período II), raça (negro), idade de diagnóstico (≥ 11 anos) e a ausência de auto-imunização estavam associados à presença de obesidade. Assim foi possível aos autores concluir que ao início da doença, a prevalência de obesidade foi triplicada da década de 80 até a década de 90, seguindo uma tendência da população em geral. O ganho de peso pode ser um fator acelerador do início da diabetes insulino-dependente e pode ter contribuído para o aumento da incidência de diabetes em jovens observadas em algumas populações.

Em seu artigo, LUDVIGSSON⁶², 2006, chama a atenção do aumento constante da incidência da diabetes. Relata haver um largo espectro na Síndrome da Diabetes, onde a do tipo I pode ter uma progressão lenta com a secreção residual de insulina e sem auto-anticorpos, ao passo que o fenótipo tipo II pode ser capaz de produzi-los. Menciona inclusive que um único paciente pode apresentar traços de ambos os tipos. Sua etiologia ainda não é

totalmente conhecida, no entanto, fatores relacionados ao meio desempenham um papel importante em indivíduos geneticamente susceptíveis. A procura por uma causa única da diabetes permanece confusa, uma vez que, diferentes mecanismos parecem atuar. Em certos mecanismos parece levar as ilhotas a uma inflamação ao passo que, em outras, mecanismos adicionais podem aumentar a demanda por insulina e causar deficiência deste hormônio, com a manifestação clínica da diabetes. Várias hipóteses sobre sua etiologia podem combinar diferentes partes do processo da doença. Assim, falhas na higiene pode contribuir para um desequilíbrio do sistema imune, facilitando reações auto-imunes quando na presença de infecções, por exemplo. O aumento da demanda de insulina provocado pelo crescimento rápido, ou a resistência à insulina causada pelo stress, infecções, adolescência, etc., levam as células beta à exaustão e na presença de antígenos, podem causar, ambos, uma reação auto-imune em indivíduos geneticamente predispostos. Assim, esta deficiência de insulina leva à manifestação de diabetes em pessoas que perderam a função destas células beta. O autor finaliza informando que vitaminas podem modular o processo imune, porém, é sabido que esta substituição é muito pequena. Entretanto, é notório que a falta de exercício físico, obesidade e stress, aumentam a requisição de insulina, resultando em sua deficiência. Dessa forma podemos intervir, prevenindo a Síndrome Diabética.

2.2 Diabetes mellitus e doença periodontal

Em 1983, um estudo cruzado conduzido por GUSBERTI et al.³⁶ examinou a gengivite que ocorria durante a puberdade em uma população de diabéticos juvenis insulino-dependentes. 77 crianças com idade entre 6 e 15 anos foram avaliadas segundo os índices gengivais, estágios de maturação puberal, e níveis de glicose no sangue e hemoglobina glicosilada. Amostras de placa dentária de uma ou mais superfícies proximal dentária foram recolhidas para cada indivíduo, e cultivadas sobre condições aeróbicas e não aeróbicas em meios de cultura seletivos e não seletivos. O total da flora cultivável e a porcentagem de algumas bactérias, presumivelmente, periodontopatogênicas foram determinadas. Os resultados apontaram que, antes da puberdade,

crianças com elevados níveis de hemoglobina glicosilada também tinham índices gengivais mais altos do que crianças com o controle metabólico normal da diabete. Durante a puberdade, o nível da gengivite aumentou, independentemente, para ambos, glicose sangüínea em jejum e porcentagens de hemoglobina glicosilada. A microbiota da placa marginal foi predominantemente composta de bactérias anaeróbias facultativas. Por fim, as porcentagens de *Capnocytophaga sp* e *Actinomyces naeslundii* foram estatisticamente maiores ao início da puberdade, sugerindo que uma específica mudança bacteriana na composição microbiana da placa ocorre em resposta às mudanças do hospedeiro diabético juvenil nesta idade.

PINDUCCIU et al.⁹², 1996, estudaram 131 pacientes com diabetes mellitus tipo I (IDDM) e 20 controles saudáveis, os quais foram avaliados para a presença de doenças periodontais e para alguns parâmetros orais microbiológicos. Os resultados demonstraram que pacientes IDDM, estando bem compensados do ponto de vista clínico e metabólico, mostravam uma prevalência de periodontopatias apenas discreta comparados aos controles. Somente a presença de gengivite era significativamente maior em IDDM do que em controles. Ambas as microfloras, aeróbica e anaeróbica, não demonstraram diferenças substanciais para nenhum grupo. Entre os fatores antibacterianos salivares, a lisozima sofreu uma significante queda em pacientes diabéticos comparados aos controles. Concluíram que, pacientes IDDM são submetidos às complicações periodontais em uma freqüência semelhante àquela experimentada por pacientes saudáveis, desde que estejam sob um estrito controle metabólico e clínico.

FIRATLI; YILMAZ; ONAN²³, 1996, examinaram as condições periodontais de 77 crianças e adolescentes diabéticas, pareadas com 77 crianças sistemicamente saudáveis por sexo e idade. A glicose sangüínea em jejum, frutamina e a hemoglobina glicosilada (HbA1) tiveram seus valores determinados. A média da profundidade das bolsas, níveis clínicos de inserção e os parâmetros para analisar a diabetes, do grupo diabético, foram significativamente maiores do que os valores obtidos para o grupo controle. Os autores encontraram uma correlação positiva entre a duração da diabetes e a

perda de inserção clínica, mas não para profundidade das bolsas, índice de placa e índice gengival, no grupo diabético. Uma correlação positiva também foi registrada entre a presença de frutossamina no soro e o índice gengival no grupo diabético, mas não no grupo controle.

KARJALAINEM; KNUUTTILA⁴⁴, 1996, avaliaram o sangramento gengival (sangramento à sondagem) e a higiene oral (porcentagem de placa) em dois grupos de crianças e adolescentes com diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM). O primeiro grupo estudado incluía 12 crianças e adolescentes diabéticos recém-diagnosticados (idade entre 6,3 a 14,0 anos, 5 meninos e 7 meninas). Os participantes foram examinados no terceiro dia após sua admissão no hospital e 2 e 6 semanas após o início do tratamento com insulina. O sangramento gengival diminuiu após 2 semanas do tratamento com insulina (37,8 contra 19,0%, $p < 0,001$, teste t pareado), e permaneceu no mesmo nível quando examinado um mês após, enquanto que o balanço de glicose era excelente. O outro grupo ($n = 80$) de crianças e adolescentes diabéticos insulino-dependente (idade entre 11,7 a 18,4 anos, 44 meninos e 36 meninas) com média de duração da diabetes de 6 anos (entre 0,3 a 15,0 anos) foram examinados 2 vezes em intervalos de 3 meses. Indivíduos com um controle ruim de glicose sanguínea (hemoglobina glicosada, HbA1, com valores acima de 13%) apresentavam mais sangramento gengival (46,3% no primeiro exame, 41,7% no segundo exame) comparados a indivíduos com valores HbA1 menores do que 10% (média de sangramento gengival 35,2% e 26,9%) ou com indivíduos HbA1 com valores entre 10 a 13% (média de sangramento gengival 35,6% e 33,4%, respectivamente). As diferenças foram significantes em ambos os exames ($p < 0,05$, Anova), e permaneceu significativa após a tabulação dos grupos por idade, idade e início da diabetes, duração da diabetes e estágio da puberdade (Ancova). Os resultados não foram relacionados às diferenças ou mudanças no índice de placa dentária, suportando o conceito de que a descompensação do metabolismo da glicose associada à diabetes predispõe à inflamação gengival. Um aumento no sangramento gengival em associação com a hiperglicemia sugere que alterações biológicas associadas à hiperglicemia, as quais diminuem a resistência do hospedeiro à placa, ocorreram aparentemente. Por fim, concluem que, em consequência deste

quadro, ainda que nem todas as gengivites evoluam para uma doença periodontal destrutiva, a prevenção de inflamação gengival iniciada por placa, deverá ser enfatizada. Particularmente em crianças e adolescentes com um controle deficiente da diabetes.

Para STEIN et al.¹¹³, 1997, estudos prévios têm demonstrado que a diabetes tipo I (IDDM) aumenta o risco de desenvolver periodontite em 2 a 3 vezes. Pacientes com IDDM exibem uma destruição das células beta pancreáticas, mais provavelmente causada por uma reação auto-imune. Há um acúmulo de evidências que suportam o papel da resposta imunológica na patogênese periodontal. A citocina, interleucina (IL)-10, tem sido relatada por promover seletivamente a expansão de uma linhagem de linfócitos B (CD5/LY1/B1), os quais têm a tendência para secretar altos níveis de anticorpos. Consequentemente, os autores tiveram como objetivo avaliar a produção de IL-10, a porcentagem de células B CD5 e a frequência de células secretoras de anticolágeno, em células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes IDDM e controles pareados por idade, sexo e raça. A produção de IL-10 foi avaliada por ELISA utilizando o sobrenadante de células sanguíneas periféricas aderidas, cultivadas por 24 horas na presença de lipopolissacarídeos (LPS) de *P. gingivalis*. Em 8 de 31 pacientes, os níveis IL-10 foram aumentados significativamente na IDDM comparados com os controles e uma maior porcentagem de células B CD5 também foram observadas pelo fluxo citométrico. Em adição, estes pacientes exibiram uma maior frequência de células secretoras de anticolágeno, evidenciadas por ELISPOT. Além disso, o tratamento com um neutralizante anti-IL-10, diminuiu a resposta aos anticorpos anticolágeno em 70%. Com estes achados, os autores suportaram o conceito de que uma subclasse de pacientes IDDM possui uma vigorosa resposta IL-10 subsequente a exposição à LPS Gram-negativos, os quais poderiam predispor estes pacientes ao desenvolvimento de periodontite através de um mecanismo auto-imune amplificado.

As condições periodontais de 44 crianças e adolescentes diabéticos insulino-dependentes e 20 controles saudáveis foram comparadas por FIRATLI²⁴, 1997, por um período de 5 anos. Os valores da glicose no sangue

em jejum, frutossamina e hemoglobina glicosilada (HbA1), foram determinados no início e após 5 anos. As diferenças nos parâmetros clínicos e laboratoriais foram comparadas durante o intervalo do estudo. As diferenças entre os dois grupos também foram avaliadas. A única diferença estatisticamente significativa observada no grupo diabético foi para a perda de inserção clínica (CAL). A CAL estava estatisticamente maior no grupo diabético comparado ao grupo controle, e uma correlação positiva, estatisticamente significativa, foi observada entre a duração da diabetes e a CAL. A frutossamina também foi correlacionada com o índice gengival no grupo diabético, enquanto não havia correlação com o grupo controle. Assim, concluiu-se que a diabetes modifica o estado clínico dos tecidos periodontais e aumenta a perda de inserção clínica.

Para FENESY²¹, 1998, a doença periodontal é agora vista como resultante de uma complexa relação entre infecção bacteriana e resposta do hospedeiro, frequentemente modificada por fatores diversos. Houve uma mudança fundamental na prevalência do modelo de doença periodontal da década de 60, o qual sugeria que a susceptibilidade à periodontite aumentava com a idade, e que todos os indivíduos eram susceptíveis à doença periodontal severa. Pesquisas mais recentes têm mudado a crença na susceptibilidade universal para uma visão mais atual de que somente 5 a 20% de qualquer população será diagnosticada com periodontite severa generalizada, e que somente em sua forma moderada, a doença afetará a maioria da população adulta. Um dos maiores fatores de risco é o tabagismo, visto que agora é clara a associação entre o hábito de fumar e a doença periodontal, independente de higiene oral, idade ou outro fator de risco. Na periodontite humana, não há uma ligação única e direta de bactéria-doença. Há ao menos três patógenos que tem uma forte associação com a doença periodontal progressiva: *A. actinomycetemcomitans*, espiroquetas da gengivite necrosante aguda e *P. gingivalis*. Estes patógenos podem ser a causa da perda contínua de inserção periodontal em todas as modalidades de doença periodontal independente da terapia periodontal dispensada. Esta perda de inserção, ou destruição do ligamento periodontal e perda de suporte ósseo, é vista na periodontite adulta, assim como na periodontite de início precoce, a qual afeta indivíduos jovens que aparentam-se saudáveis. As três formas de periodontite de início precoce

são a periodontite pré-puberal, periodontite juvenil localizada ou generalizada, e periodontite de progressão rápida. Elas são distinguíveis da periodontite adulta pela idade do começo da doença, a rápida taxa de progressão, manifestação de falhas na resposta do hospedeiro e a composição da microflora subgengival. A periodontite pré-puberal está associada à perda da inserção em volta do dente na dentição decídua e/ou permanente, e frequentemente está associada com defeitos congênitos severos de origem hematológica, e alterações na função quimiotáxica dos neutrófilos. A periodontite também pode ser associada com condições sistêmicas, tais como desordens metabólicas (diabetes mellitus, alterações hormonais femininas, etc.) desordens induzidas por drogas, desordens hematológicas/leucemia, e alterações do sistema imune. Todas estas alterações têm sido reportadas como capazes de afetar o periodonto e/ou o tratamento da doença periodontal. Em relação ao tratamento e prevenção, devemos conhecer os agentes etiológicos para pacientes específicos e o mecanismo da patogênese bacteriana na periodontite. Por fim sinaliza que, em doenças sistêmicas, na qual os tecidos periodontais são afetados, a detecção precoce e o controle terapêutico cuidadoso, com o médico e o cirurgião-dentista trabalhando em conjunto, poderão providenciar benefícios à saúde geral do paciente e maior qualidade de vida.

NISHIMURA et al.⁷⁶, 1998, baseados em suas observações em que pacientes com diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM) estão sujeitos à doença periodontal, desenvolveram uma hipótese onde que a hiper ou hipoglicemia poderia contribuir para a patogênese da periodontite diabética. Em seu artigo, apresentam fatos experimentais que corroboram esta hipótese, baseados em seus estudos, e então realizam a sua discussão. A hiperglicemia progressivamente glicosila proteínas humanas, formando produtos finais da glicação (AGE) **. Estes, por sua vez, estimulam os fagócitos a liberar citocinas

***Glicação ou glicosilação – é um processo destrutivo que ocorre em todo o corpo. Pode ser descrito como a união de uma molécula da glicose à proteína, resultando na formação de uma estrutura danificada, não funcional. A glicação altera a estrutura da proteína e diminui sua atividade biológica.*

inflamatórias tais como TNF-alpha e IL-6. Neste contexto, para entender os efeitos de episódios hiperglicêmicos na saúde periodontal, 24 adolescentes IDDM foram examinados em seu estado periodontal, e em 3 deles encontrou-se periodontite. Análises laboratoriais destes 3 pacientes revelaram que 2 tinham níveis elevados de TNF-alpha em seu soro. Estes resultados podem suportar parcialmente a hipótese de um mecanismo de complicações diabéticas nas quais um nível anormal de citocinas, induzidas pelas AGEs, poderia exacerbar as resposta inflamatórias. Em pacientes IDDM, a diabetes é frequentemente acompanhada, não somente por episódios de hiperglicemia, mas também por hipoglicemia iatrogênica. Células do ligamento periodontal (PDL) cultivadas sob condições hiperglicêmicas, foram prejudicadas em suas funções biológicas como adesão e mobilidade, ao passo que células cultivadas sob hipoglicemia (10 mg/dL) gradualmente dissociava-se de sua fixação e eram induzidas à morte celular. Estes fenômenos correlacionavam-se bem com o perfil de expressão do receptor de fibronectina. Interessantemente, estas mudanças, devidas aos diferentes níveis de glicose, eram observadas mais intensamente em PDL do que em outras células fibroblásticas, sugerindo que a função biológica das PDL era mais facilmente danificada pela variação, ou rápida flutuação, dos níveis de glicose. E, finalmente, relataram que estas observações sugeriam que a hiperglicemia poderia, indiretamente, exacerbar a destruição inflamatória do tecido por meio da ativação de células imunocompetentes pelos AGE, e que ambos, hiper e hipoglicemia, poderiam diretamente prejudicar as funções biológicas dos tecidos periodontais de união através de interações com a célula-matriz.

SALVI; BECK; OFFENBACHER¹⁰², 1998, estudando a resposta inflamatória do hospedeiro na periodontite associada a diabetes, examinaram o nível dos mediadores do fluido do sulco gengival (GCF), a secreção monocítica e o estado clínico de 39 indivíduos diabéticos insulino-dependentes (IDDM), e 64 não diabéticos, com vários graus de periodonto saudável e doente. Inicialmente encontrou-se um inesperado alto nível de GCF mediadores entre os indivíduos IDDM, mesmo em gengivite e periodontite suave. Além disso, as respostas do GCF e mediador monocítico foi em dois picos na distribuição com relação ao estado periodontal. De acordo com a Academia Americana de

Periodontia (AAP), dois grupos foram formados, Grupo A – AAP tipo I e II, reunia pacientes com gengivite e periodontite suave e assim, com uma resposta do hospedeiro baixa, e grupo B – AAP III e IV, com pacientes apresentando periodontite moderada e severa e uma resposta maior. Diabéticos apresentavam níveis GCF significativamente maiores de PGE₂ e IL-1β quando comparados a não diabéticos controles com mesma situação periodontal. Entre o grupo diabético, os níveis GCF destes mediadores inflamatórios eram quase duas vezes maiores no grupo B quando comparados aos diabéticos do grupo A. Entre os diabéticos, os níveis de TNF-α no GCF somente foram detectados minimamente não havendo diferença entre os grupos A e B. Pacientes IDDM dos grupos A e B tinham secreção inflamatória monocítica anormal em resposta ao desafio de lipopolissacarídeos (LPS) provenientes da *P. gingivalis* quando comparados a pacientes não diabéticos. Os dados sugerem que o estado diabético resulta em uma significativa secreção monocítica ajustada de PGE₂ (4,2 vezes), IL-1β (4,4 vezes) e TNF-α (4,6 vezes) quando comparada aos controles não diabéticos. Entre diabéticos, as curvas de dose-resposta para LPS demonstraram que os monócitos dos pacientes do grupo B secretaram aproximadamente 3 vezes mais PGE₂ e 6,2 vezes mais TNF-α do que aqueles do grupo A, entretanto, não havia diferença na secreção monocítica de IL-1β entre os dois grupos diabéticos. Este traço de ajuste monocítico, acredita-se, existe independentemente da presença da doença periodontal severa uma vez que, em indivíduos não diabéticos com periodontite adulta, infecções por bactérias Gram-negativas somente, não são suficientes para produzir uma hiperresposta sistêmica monocítica característica. Entre os grupos A e B diabéticos, não havia diferença significativa no controle metabólico expresso pelo nível de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}). Concluindo, os dados deste estudo sugeriam que pacientes diabéticos tinham uma resposta inflamatória exagerada em comparação a indivíduos controles não diabéticos. Em adição, entre diabéticos, indivíduos com periodontite moderada a severa (grupo B) apresentavam uma secreção monocítica significativamente elevada de PGE₂ e TNF-α frente ao desafio LPS, e níveis GCF significativamente maiores de PGE₂ e IL-1β quando comparados a pacientes do grupo A (gengivite e periodontite suave). Assim, os autores sugerem que a IDDM é um fator de risco significativo para doença periodontal

severa porque, comparado a não diabéticos, indivíduos diabéticos reagem com um anormal maior grau de inflamação a uma carga equivalente de bactérias.

Doença periodontal severa, freqüentemente coexiste com diabetes mellitus severa, pois a diabetes é um fator de risco para a doença periodontal. GROSSI; GENCO³³, 1998 apresentaram um modelo segundo o qual a doença periodontal severa aumenta a severidade da diabete e complica seu controle metabólico. Os autores propuseram que uma infecção mediada pelo ajuste do ciclo da síntese e secreção de citocinas estimuladas de forma crônica a partir de lipopolissacarídeos (LPS) e produtos de organismos periodontopatogênicos, pode amplificar a magnitude da resposta citocínica regulada pelas AGEs na diabetes mellitus. No modelo apresentado pelos autores, a combinação das duas vias, infecção e ajuste citocínico AGE-dependente, ajuda a explicar o aumento na destruição tecidual visto na periodontite diabética, e como a infecção periodontal pode complicar a severidade da diabete e o grau de controle metabólico, resultando em uma relação de 2 vias entre diabetes mellitus e doença periodontal/infecção. Este caminho duplo proposto para a destruição tecidual sugere que o controle da infecção periodontal crônica é essencial para alcançar um controle da diabetes por um longo período. Neste trabalho ainda, foi evidenciada a hipótese de que a eliminação da infecção periodontal pelo uso de antibióticos sistêmicos melhora o controle da diabetes, determinado pela redução na hemoglobina glicosilada ou a redução da necessidade de insulina.

Para IUGHETTI et al.⁴¹, 1999, crianças com diabetes mellitus insulino-dependente tem menores taxas de fluxo salivar, pH e capacidade tampão; porém um maior conteúdo de glicose e concentração de cálcio, magnésio, IgA e peroxidase em comparação a crianças saudáveis. Não obstante, a incidência de cáries é menor do que o normal em crianças diabéticas com bom controle metabólico da doença. A doença periodontal inicia-se na puberdade como uma gengivite suave sem sangramento e recessão gengival, e pode transformar-se em periodontite severa, especialmente em crianças com controle ruim da diabetes. Microangiopatias, que prejudicam a resposta imune, uma microflora bacteriana diferente e o

metabolismo do colágeno estão envolvidos na patogênese da doença periodontal diabética. A flora gengival é, geralmente, composta de bactérias anaeróbias Gram-negativas, ao passo que o colágeno tem uma menor solubilidade e é atrófico e inadequado para suportar as forças de oclusão. Concluem relatando que, por estas razões, a prevenção da periodontite é muito importante em crianças diabéticas, por meio de instrução de higiene oral e visitas regulares ao dentista.

Em 2000, NOACK et al.⁷⁹, com o objetivo de determinar se a predisposição a doenças metabólicas, tais como a diabetes mellitus (ainda não diagnosticada) ou a hiperlipidemia, poderiam ser indicadores de risco à periodontite, realizaram o estudo descrito a seguir: 100 pacientes entre 40 a 70 anos foram examinados e classificados em tolerância à glicose comprometida (IGT), mas sem a diabetes manifestada (56 pacientes), hiperlipidemia (HL) (17 pacientes) e estado metabólico normal (27 pacientes controle). Profundidade de sondagem (PD) nível de aderência (AL), índice de placa (PI) e sangramento gengival à sondagem (BOP) foram registrados. O título de anticorpos no soro (SAT) para *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* foi determinado pelo método ELISA, assim como um “pool” de placa subgengival foi analisado usando imunofluorescência indireta para detectar os mesmos organismos. Também foi avaliada a atividade enzimática respiratória de leucócitos polimorfonucleares periféricos (PMN), neste caso neutrófilos, por quimioluminescência (CL). Os resultados não demonstraram diferenças significantes entre os grupos IGT e controle para BOP, PI, PD, AL, SAT e para a porcentagem de microrganismos periodontais. O grupo IGT demonstrou uma média significativamente maior para o nível de triglicerídeos séricos, assim como uma maior quimioluminescência estimulada por formilpeptídeos (formyl-methionyl-leucil-phenylalanine) – FMLP-PMN-CL, comparado ao grupo controle. Pacientes com HL demonstraram um número significativamente maior de sextantes com aumento de PD (73,4%) comparado ao grupo controle (50,65). Resultado similar foi obtido quando comparou-se a porcentagem de todos os sítios com aumento de PD (HL = 16,7%; controle = 12,3%). A média de FMLP-PMN-CL em pacientes HL foi significativamente maior do que o grupo controle. Encontrou-se uma pequena, mas significativa, correlação entre PD e

níveis de lipídeos em todos os pacientes. Também foi observada uma correlação significativa entre níveis séricos de lipídeos e FMLP-PMN-CL. Face aos resultados descritos, os autores concluem que, a tolerância anormal à glicose, que é um fator predisponente à diabetes mellitus, não parece ser um fator de risco à doença periodontal. Por outro lado, o metabolismo lipídico alterado parece ser um fator de risco à periodontite.

A diabetes tipo I é causada pela destruição das células beta do pâncreas devido à auto-imunidade. Auto-anticorpos contra ácido glutâmico descarboxilase (GAD) 65 expressos nas células beta pancreáticas são amplamente utilizados como marcadores preditivos da destruição pancreática. Neste estudo de KONO et al.⁵², 2001, os autores teorizaram que se certas células nos tecidos periodontais poderiam expressar GAD, então estas poderiam influenciar na titulação de anticorpos contra este GAD. Utilizando (1) a análise da transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para determinar GAD 65 mRNA em várias células; (2) a análise da seqüência de nucleotídeos para confirmar se o produto amplificado pela PCR era o gene que codificava a GAD; (3) e o western blotting para determinar a expressão de proteína GAD 65 nos fibroblastos gengivais humanos. A coloração por imunohistoquímica da proteína GAD 65 em gengival normal e inflamada foi realizada para examinar a potencial influência da inflamação sobre a expressão do GAD 65. A titulação de GAD anticorpos no soro de pacientes periodontais, bem como em pacientes saudáveis, foi medida para determinar se pacientes periodontais poderiam desenvolver auto-anticorpos contra GAD 65. As culturas de gengiva humana, fibroblastos periodontais e dérmicos, e células mesangiais expressaram GAD mRNA. A análise da seqüência de nucleotídeos confirmou os produtos amplificados da PCR como sendo GAD 65. As análises por western immunoblotting e coloração imunohistoquímica revelaram que a proteína GAD 65 era expressa *in vitro* e *in vivo*. A expressão de GAD 65 em tecidos inflamados era maior do que em tecidos normais. Dois dos 62 pacientes periodontais sem diabetes demonstraram um aumento da titulação de anticorpos contra GAD 65, enquanto que nenhum paciente sistemicamente saudável apresentou aumento na titulação de anticorpos contra este antígeno. Dessa forma, concluíram que a inflamação periodontal pode resultar em

aumento nos níveis de GAD e influenciar a titulação de GAD anticorpos, e, conseqüentemente, afetar o diagnóstico diabético baseado na produção de GAD anticorpos.

De acordo com GREGHI et al.³², 2002, em indivíduos diabéticos nota-se maior sangramento gengival, profundidade de sondagem, perda de inserção, perda óssea e prevalência mais acentuada da periodontite avançada. Entre as alterações teciduais ocorridas no periodonto, destaca-se como um dos fatores causais a modificação na atividade e expressão dos fatores de crescimento. A fibronectina, que funciona como sinalizador para as células periodontais, se altera, culminando com a morte das células do ligamento periodontal e com a diminuição da resposta quimiotática das células. O infiltrado do tecido conjuntivo é caracterizado pela presença de menor número de fibroblastos e colágeno e, maior número de plasmócito. Uma conseqüência da hiperglicemia é a glicosilação e oxidação que resultam na formação de produtos que se acumulam nos tecidos, com efeito patogênico, devido à interação com receptores em células endoteliais e monócitos, levando a uma inflamação crônica, com produção de mediadores que induzem a reabsorção óssea e destruição de tecido.

Segundo LOPEZ et al.⁶⁰, 2003, os componentes salivares podem sofrer variações que podem ser detectadas por análise química. Nos resultados de seu estudo demonstraram que o pH ácido diminui o fluxo salivar e que o excesso de espuma é normalmente encontrado na saliva de crianças diabéticas. O total de açúcares, glicose, uréia e proteínas foram maiores em pacientes diabéticos do que no controle enquanto o cálcio diminuiu. Essas diferenças foram confirmadas pelo teste de discriminação. As crianças diabéticas têm maiores valores de CPOD e ceo e CPOS e ceos quando comparadas àquelas do grupo controle apesar do menor consumo de açúcar. Concluem dessa forma, aludindo que alguns componentes salivares e a diminuição do fluxo salivar podem estar envolvidos na caracterização da saúde oral das crianças diabéticas.

Com o objetivo de determinar se a destruição periodontal detectável e as alterações salivares estavam relacionadas e presentes na diabetes tipo I (DM tipo I) em crianças comparadas com controles saudáveis, AREN et al.⁶, 2003, estudaram 16 crianças recém diagnosticadas com DM (grupo I), 16 crianças com DM tipo I de longa duração (grupo II) e 16 crianças saudáveis (grupo 3). A saúde periodontal era avaliada pelo índice de placa, índice gengival, sangramento à sondagem e profundidade de sondagem. O fluxo salivar, pH, capacidade tampão e atividade de peroxidases em saliva estimulada também foram determinados. Os dados foram analisados pelos testes Kruskal-Wallis, teste t de Student e análise de correlação de Pearson. A média dos valores para a capacidade tampão e pH salivar dos pacientes diabéticos foram significativamente menores comparados aos controles. Os valores do índice de placa para os grupos diabéticos foram significativamente maiores do que os controles. A média do índice gengival para o grupo I foi estatisticamente menor do que para o grupo II. A média da profundidade de sondagem apresentada pelo grupo I foi semelhante àquela obtida para os controles não diabéticos, mas a média da profundidade de sondagem para o grupo DM tipo I foi significativamente maior dos para os grupos não diabéticos e grupo I. O grupo I apresentou maior sangramento à sondagem, com significância estatística, comparado aos outros dois grupos ($p < 0,05$). Concluindo, sugeriram que o estado glicêmico dos indivíduos diabéticos afetam as profundidades de sondagem, pH salivar, capacidade tampão e a atividade da peroxidase.

Para UNLU et al.¹²⁵, 2003, o fator vascular de crescimento endotelial (VEGF) induz a proliferação de células endoteliais, estimula angiogênese, e aumenta a permeabilidade vascular, mas as informações sobre o seu papel nas lesões periodontais é limitado. Dessa forma, o objetivo de seu estudo foi determinar a associação entre a expressão de VEGF em tecidos periodontais saudáveis e doentes de pacientes diabéticos e não diabéticos. Dez pacientes sistemicamente saudáveis e 10 diabéticos tipo II (DM), todos diagnosticados com periodontite participaram deste estudo. Amostras de gengiva foram coletadas de sítios saudáveis e doentes em todos os pacientes. Cada paciente foi seu próprio controle. Em adição, 10 pessoas sem qualquer doença,

sistêmica ou periodontal, foram escaladas para servir de grupo controle negativo. No grupo controle negativo, nenhuma expressão de VEGF foi encontrada nas amostras. Entre os 10 pacientes sistemicamente saudáveis, não houve evidência de expressão de VEGF nas amostras gengivais saudáveis, mas foi encontrada nos tecidos doentes em 2 casos. Nos pacientes diabéticos, VEGF foi observada em 4 amostras de tecido gengival saudável e em 6 sítios periodontais. VEGF estava intensamente presente nos monócitos e macrófagos. Assim, este estudo demonstrou que a VEGF está aumentada em tecidos gengivais de pacientes diabéticos, em especial naqueles com doença periodontal.

2.3 Periodontopatógenos

EISENMANN et al.²⁰, 1983, determinaram a ocorrência subgengival de *A. actinomycetemcomitans* e *Capnocytophaga* em 12 pacientes com periodontite juvenil localizada (PJL) e 10 com gengivite, residentes no Panamá, usando técnicas de cultura seletiva. *A. actinomycetemcomitans* estava presente em todas as lesões de PJL estudada e foi, na média, encontrado cem vezes em maior número nestas do que em lesões de gengivite. *Capnocytophaga* foi encontrada em três vezes mais em PJL do que em gengivite. Este estudo confirma e reafirma dados anteriores que indicam uma extrema relação entre *A. actinomycetemcomitans* e PJL. Os autores propõem ainda que a identificação de *A. actinomycetemcomitans* pode ser um valioso auxiliar para o diagnóstico da PJL.

Um estudo cruzado conduzido por GUSBERTI et al.³⁶, 1983, examinou a ocorrência, durante a puberdade, de gengivite em uma população de diabéticos juvenis insulino-dependentes. 75 crianças com idade entre 6 e 15 anos foram avaliadas em relação aos níveis de gengivite, estágios de maturação puberal e níveis de glicose e hemoglobina glicosilada. Amostras de placa dentária foram retiradas de uma ou mais superfícies dentárias proximais de cada indivíduo, e cultivadas sob condições aeróbicas e anaeróbicas em meio seletivo e não seletivo. O total da flora cultivada e a porcentagem de presumíveis bactérias periodontopatogênicas foram determinados. Antes da

puberdade, crianças com altos níveis de hemoglobina glicosilada também demonstravam maiores níveis de gengivite do que crianças com controle metabólico normal da diabetes. Durante a puberdade, o nível de gengivite aumentou independentemente para ambos, níveis de glicose sangüínea em jejum e porcentagem de hemoglobina glicosilada. A microbiota da placa marginal foi predominantemente composta de bactérias anaeróbias facultativas. As porcentagens de *Capnocytophaga sp* e *A. naeslundii* foram estatisticamente maiores no começo da puberdade, sugerindo que uma específica mudança no meio bacteriano, em sua composição microbiológica da placa marginal, ocorre em resposta às mudanças que ocorrem no hospedeiro diabético juvenil neste período de idade.

O *A. actinomycetemcomitans* é uma bactéria oral Gram-negativa a qual tem sido relacionada na etiologia da periodontite juvenil localizada (PJL). Neste trabalho de ZAMBOM; CHRISTERSSON; SLOTS¹²⁸, 1983, 403 indivíduos de quatro grupos de estudo foram examinados para este microrganismo na placa dentária subgengival. Um “pool” de amostras de ao menos 6 sítios periodontais foi incluído para cada indivíduo. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 28 de 29 pacientes com PJL, mas somente em 15% dos outros indivíduos que incluíam 28 de 134 pacientes com periodontite adulta, 24 de 142 indivíduos periodontalmente saudáveis e 5 de 98 diabéticos insulino-dependentes juvenis com variados graus de gengivite. *A. actinomycetemcomitans* isolados a partir de membros de 5 famílias de pacientes com PJL foram biotipados com base na fermentação variável da dextrina, maltose, manitol e xilose, e sorotipados através da imunofluorescência indireta usando sorotipo específico de anti-soro de coelho. Observando indivíduos de uma mesma família, todos hospedavam esta bactéria de mesmo biotipo e sorotipo. Entretanto, mesmo em famílias com indivíduos superinfectados com *A. actinomycetemcomitans*, alguns membros não demonstravam estar infectados com o microrganismo. A suposta pobre transmissibilidade do patógeno entre os indivíduos pode, em parte, explicar a completa baixa prevalência de periodontite juvenil localizada e o modelo familiar da doença. A alta prevalência de *A. actinomycetemcomitans* na placa subgengival de pacientes com PJL, comparada à menor prevalência em outros

grupos de pacientes, suporta a hipótese que o *A. actinomycetemcomitans* é um agente etiológico nesta doença periodontal. Dessa forma os autores finalizam sugerindo que, os motivos de uma infecção com *A. actinomycetemcomitans* resultar em um colapso periodontal e com destruição periodontal localizada simplesmente não são conhecidas, mas que há algumas hipóteses que tentam explicá-las.

A diabetes juvenil tem sido implicada como um fator de aumento da susceptibilidade à gengivite e periodontite na puberdade. Entretanto, poucos dados estão disponíveis sobre as mudanças da flora microbiana que ocorrem com o início da puberdade. Neste estudo de MORINUSHI et al.⁷⁰, 1989, foi executado para determinar se a titulação de anticorpos antibacterianos contra microorganismos associados à doença periodontal poderia ser útil em revelar mudanças na flora da placa no início e final da puberdade. Foi obtido o soro de 35 indivíduos (idade entre 7 a 18 anos) selecionados de uma população de diabéticos insulino-dependentes. Também foram examinados em relação à maturação sexual e o exame dentário incluía o registro do início e magnitude do sangramento de acordo com o índice de sangramento papilar. Os títulos de anticorpos para *A. naeslundii*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. ochracea* e *T. denticola* foram determinados utilizando microELISA. A estratificação de títulos de anticorpos por grupos etários (≤ 12 anos, 12 a 15 anos, > 15 anos) revelou que os títulos para *A. naeslundii* aumentaram significativamente ($p < 0,025$, ANOVA) e progressivamente ($p < 0,05$, análise de regressão) com o aumento da idade. Em contraste, os títulos para *F. nucleatum* foram máximos abaixo de 12 anos e diminuíram com a idade (ANOVA, $p < 0,05$; análise de regressão, $p < 0,05$). Não houve variação significativa na titulação observada para os outros organismos. A estratificação pela maturidade sexual revelou um decréscimo progressivo similar à titulação para *F. nucleatum* (ANOVA, $p < 0,05$; análise de regressão, $p < 0,005$). Em adição, a análise da matriz de correlação, com um intervalo de confiança de 95%, indicou que os títulos para *P. intermedia* igualaram-se ao *A. actinomycetemcomitans*, e estes à titulação de *F. nucleatum*. Face a estes resultados, os autores concluíram que, enquanto a

relação entre a flora oral e a diabetes permanece incerta, os achados sugerem que há uma mudança significativa nesta flora durante a puberdade.

O estudo de NAKAGAWA et al.⁷³, 1991, caracterizou o perfil microbiano do sulco gengival em crianças. Amostras subgengivais de 36 lesões de gengivite de 18 pacientes e 36 sítios em 18 pessoas saudáveis foram avaliadas. Os indivíduos testados foram divididos em três estágios de acordo com a maturação fisiológica em primeira infância, idade escolar e peri-puberdade. A puberdade foi confirmada através de exame da radiografia de pulso. Utilizando técnicas anaeróbicas, as amostras foram isoladas, diluídas e então inoculadas em meio seletivo e não seletivo e cultivadas sob condições apropriadas de fase gasosa (anaerobiose). Os isolados foram identificados microbiologicamente e contados. Todos os valores avaliados estatisticamente. As amostras foram examinadas simultaneamente através de microscopia de campo escuro. Mudanças na proporção e frequência das bactérias periodontopatogênicas foram distintas nos diferentes estágios da maturação fisiológica. Espécies bacteróides preto-pigmentados foram normalmente encontradas nas lesões de gengivite. *Bacteroides intermedius* (*B. intermedius*) estavam frequentemente detectados nas amostras de placa em crianças com gengivite. Em todos os estágios, a proporção de bacteróides preto-pigmentados e *B. intermedius* nos grupos com gengivite foram significativamente maiores do que em grupos saudáveis. A análise estatística revelou que os níveis de *B. intermedius* aumentaram no estágio peri-puberal comparados com os dois estágios mais jovens. Bacteróides preto-pigmentados e estavam fortemente relacionados com índices clínicos (índice gengival (GI), placa (PII)) nos 3 estágios. *P. gingivalis* foi encontrada somente em dois sítios de gengivite de crianças na fase peri-puberal com gengivite. O *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 4 de 12 sítios em escolares, e 6 de 12 sítios no grupo peri-puberal com gengivite, respectivamente. Ainda no grupo peri-puberal, a proporção de *A. actinomycetemcomitans*, para os que apresentavam gengivite, foi significativamente maior do que o grupo saudável, e o *A. actinomycetemcomitans* estava diretamente relacionado aos índices clínicos (GI, PII, índice de cálculo (CI) e profundidade de sondagem (PPD)). *E. corrodens* foi encontrada associada com gengivite nos grupo escolares e peri-

puberal. Não foi encontrada correlação na detecção de *F. nucleatum* nos 3 estágios. Por fim, o exame microscópico demonstrou que a proporção de bastonetes, fusiformes, filamentosos, bastonetes móveis e espiroquetas nos grupos com gengivite foi significativamente maior do que nos grupos saudáveis, enquanto que a proporção de cocos nos grupos gengivite foi significativamente menor do que em crianças saudáveis para os 3 estágios. Os espiroquetas estavam estritamente relacionados aos índices clínicos (GI, PII, PPD) em todas as faixas etárias.

Um grupo de pacientes com diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM), pobremente controlada, foi examinado em um estudo realizado por MANDELL et al.⁶⁵, 1992, com um delineamento de seção-transversal, para os níveis totais de microrganismos, incidência microbiana e a porcentagem dos níveis de microrganismos periodontais selecionados. Estes organismos foram selecionados com base em estudos anteriores que os associava com doença e saúde periodontal. Um sítio periodontalmente saudável e um sítio periodontalmente doente foram examinados em cada paciente IDDM. Aumento nos níveis dos patógenos periodontais *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *B. gracilis*, *E. corrodens*, *F. nucleatum* e *C. rectus* (antiga *Wolinella recta*) foram encontrados nos sítios periodontalmente doentes. Aumento na prevalência dos organismos *P. intermedia*, *P. melaninogenica* e *C. rectus* foram encontrados nos sítios que exibiam bolsas profundas e perda de inserção.

Segundo DAHLÉN¹⁸, 1993, a doença periodontal é o resultado clínico de uma complexa interação entre hospedeiro e bactérias da placa. Embora uma especificidade em algum grau seja encontrada para *A. actinomycetemcomitans* na periodontite juvenil localizada (LJP), tem sido difícil obter evidências para um papel etiológico específico das bactérias associadas à doença periodontal em adultos. O que se observa é a rede de resultados das interações parasita-hospedeiro as quais, em um momento não previsível, acumulam-se e excedem o limiar da integridade tecidual. Esta hipótese é concomitante com a visão da doença periodontal como sendo uma infecção polimicrobiana, predominantemente anaeróbica, a qual ocorre comumente na cavidade oral. Alguns microrganismos (marcadores de risco) ocorrem mais

frequentemente do que outros e podem determinar significativamente as conseqüências desta interação parasita-hospedeiro. Amostragem microbiológica e sua análise parecem ser de valor limitado na avaliação do risco; entretanto, podem ser utilizadas como ferramentas no diagnóstico da LJP e infecções agudas, e nas decisões de tratamento e terapia de controle de pacientes refratários. Os patógenos suspeitos (marcadores de risco) são *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e algumas espécies de espiroquetas, enquanto o papel da *P. intermedia*, *B. forsythus*, *F. nucleatum*, *C. rectus* e *P. micros* é mais incerto. Assim, o autor conclui que a presença de periodontopatógenos, assim como as entéricas, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* especialmente, deve ser considerada em pacientes com desordens sistêmicas – por exemplo, diabetes mellitus, neutropenia, agranulocitose, e AIDS – ou com implantes.

Este estudo de NAKAGAWA et al.⁷⁴, 1994, examinou as respostas sorológicas de IgG e IgM contra *P. gingivalis* e 3 sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, e as correlações destas respostas com a idade e infecção homóloga. Um total de 90 indivíduos: 40 com gengivite, 40 periodontalmente saudáveis e 10 adultos com periodontite. Os indivíduos com gengivite e saudáveis foram divididos em 4 fases baseados em sua idade fisiológica: primeiros anos, idade escolar, puberdade e adultos. No grupo gengivite, houve uma correlação positiva entre aumento a idade e aumento nos níveis sorológicos de anticorpos IgG contra *P. gingivalis* até a puberdade. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a puberdade e o estágio adulto. A média dos níveis de anticorpos IgG contra *A. actinomycetemcomitans* no grupo gengivite em escolares foi significativamente maior do que no grupo gengivite para os primeiros anos em todos os sorotipos testados. ($p < 0,01$). No sorotipo c, níveis de anticorpos IgG no grupo gengivite em idade escolar foram significativamente maiores do que nos grupos gengivite primeiros anos e adulto ($p < 0,01$). Por fim, os autores encontraram para ambos, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, positivas correlações entre níveis elevados de IgG e infecções por estes microrganismos nos grupos gengivite puberdade e periodontite adulto.

Em um trabalho de 1995, THORSTENSSON; DAHLÉN; HUGOSON¹¹⁹ examinaram a flora subgengival e a resposta sorológica dos anticorpos de diabéticos insulino-dependentes de longa-duração e pareou-os com não diabéticos por idade e sexo. A amostra consistia de 9 diabéticos entre 40-49 anos e 19 entre 50-59 anos de idade, 13 não diabéticos entre 40-49 e 21 entre 50-59 anos. As espécies bacterianas estudadas (*A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *Capnocytophaga ssp*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*) foram encontradas tanto nos diabéticos como nos não diabéticos. Significativamente mais diabéticos em ambos os grupos de idade abrigavam *P. gingivalis* comparados aos não diabéticos. A prevalência de *P. gingivalis* foi associada com a profundidade das bolsas periodontais entre os não diabéticos, mas não entre os diabéticos. A titulação sorológica dos anticorpos para a maioria dos antígenos foi similar em diabéticos e não diabéticos. Estes resultados sugeriram que, embora os patógenos microbianos sejam necessários, sozinhos não são suficientes para o desenvolvimento da doença periodontal, outros fatores influenciam a atividade da doença, como por exemplo, a susceptibilidade do hospedeiro, neste representada pela diabetes.

A ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em placa subgengival de 24 pacientes com periodontite juvenil foi determinada por LOPEZ; MELLADO; LEIGHTON⁶¹, 1996, utilizando-se sonda de DNA. 36 amostras de placa subgengival de 36 bolsas com profundidade \geq 6 mm, 3 mm ou mais de perda de inserção, e sangramento à sondagem e/ou supuração foram coletadas de 18 pacientes com periodontite juvenil localizada (LPJ, idade entre 12 a 24 anos); e 12 amostras de 6 pacientes com periodontite juvenil generalizada (GJP, idade entre 23 a 26 anos). Como controle, um número igual de amostras de sítios saudáveis nos mesmo pacientes foi estudado. *P. gingivalis* foi encontrada em 17 dos 18 pacientes LJP, e em 31 dos 36 sítios doentes. *P. intermedia* foi localizada em 15 dos 18 pacientes LJP e 28 dos 36 sítios doentes. *A. actinomycetemcomitans* estava presente em 7 dos 18 pacientes LJP e 9 dos 36 sítios doentes, mas em nenhum paciente GJP. Todos os pacientes GJP apresentavam *P. gingivalis* (11 de 12 sítios doentes) e *P. intermedia* (todos os sítios doentes). Nenhuma das três bactérias

forma encontradas em sítios saudáveis de pacientes GJP, e foram localizadas em sítios saudáveis de somente 2 de 18 pacientes LJP. Concluíram assim que, a alta prevalência e níveis de *P. gingivalis* e *P. intermedia* encontradas nos pacientes LJP e GJP estudados, sugerem que há populações afetadas pela periodontite juvenil, nas quais o tipo de periodontite está mais associado a estas espécies do que ao *A. actinomycetemcomitans*.

Neste artigo de SIXOU; ROBERT; BONNAURE-MALLET¹¹¹, 1997, os autores descrevem o caso de uma criança de 4 anos que foi consultada em abril de 1988, na Faculdade de Odontologia de Rennes (França), para verificar a mobilidade dos seus dentes decíduos, com perda prematura de 4 dentes e 2 germes de permanentes incisivos. Os exames microbiológicos por cultura revelaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*. A imunofluorescência das amostras de placa revelou a presença de *P. gingivalis*, a qual não tinha sido isolada pela cultura. As funções dos neutrófilos estavam entre os valores normais. A microscopia de transmissão de elétrons da gengiva demonstrou um epitélio desorganizado. O tecido de conexão estava infiltrado de células inflamatórias. As membranas da base estavam normais, porém o epitélio do tecido de conexão era principalmente composto de pequenos retículos epiteliais. A microscopia eletrônica de varredura dos dentes decíduos extraídos revelou falta de cimento, lacunas no cimento e falta de inserção fibrosa na parte média da raiz. Lesões na pele, principalmente na face, foram observadas. O tratamento foi pela extração dos dentes decíduos com mobilidade combinado com 3 semanas de administração de metronidazol. Acompanhamento clínico e microbiológico foi continuado por um período de 7 anos. Nenhuma lesão periodontal foi detectada desde a erupção dos dentes permanentes. A flora subgengival atual (dezembro de 1995) é composta de bactérias compatíveis com a saúde periodontal. Entretanto, o aparecimento futuro de alguma doença sistêmica, até então desconhecida, ainda é possível.

Um estudo longitudinal, desenvolvido por SBORDONE et al.¹⁰⁶, 1998, examinou ao longo de 3 anos as mudanças no estado periodontal e possíveis correlações entre a microbiota subgengival e condições diabéticas de 16 pacientes com diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM, JD) comparando-

os com seu 16 irmãos saudáveis (HS). Pacientes JD foram monitorados a cada 3 meses para os níveis de hemoglobina glicosilada (HbA_{1C}). Parâmetros clínicos e biológicos foram medidos 6 semanas antes do exame de sangue para determinar os níveis de HbA_{1C}. Os parâmetros periodontais foram medidos no início (T0), 2º ano (T2), e 3º ano (T3), incluindo: profundidade de sondagem (PD), nível de inserção (AL), índice de sangramento sulcular (SBI) e índice de placa (PI). Dois sítios em cada paciente foram selecionados para amostras microbianas: uma face mesio-vestibular do 1º molar superior (definida como sítio constante, CS) e o sítio com a maior profundidade de sondagem (definido como sítio mais profundo, DS). Amostras microbianas foram analisadas por técnicas de cultura. Não houve diferenças significantes nos parâmetros clínicos encontrados entre diabéticos e irmãos saudáveis em nenhum exame. O SBI no grupo não-diabético foi significativamente menor no T2 e T3 do que no T0. PD e AL dos sítios constantes, no grupo diabético, foi significativamente maior no T3 comparado ao T0. Houve aumento significativo da *P. intermedia* no T3 em relação ao T0 no sítio mais profundo do grupo diabético. A análise dos grupos revelou, em um estudo prévio, 2 grupos (IV e V) no T0, onde houve diferença significativa para a média geral em relação à composição de *P. intermedia* e *Capnocytophaga ssp.* Entre eles não houve diferença significativa para os parâmetros periodontais de T0 a T3. Através destes dados, os autores concluem não haver diferenças significantes nos parâmetros clínicos entre diabéticos e irmãos não-diabéticos em 3 anos de estudo longitudinal.

Para SEWON et al.¹⁰⁷, 1999, o nível basal de *A. actinomycetemcomitans* poderia ser considerado um preditor do resultado do tratamento periodontal; dessa forma, em seu estudo analisaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em 29 participantes, observada em 55 bolsas periodontais profundas, entre 37 a 75 anos, sendo 18 homens e 11 mulheres. As amostras foram coletadas antes e após a realização do tratamento periodontal. Antes do tratamento, 62% dos pacientes apresentavam 1, 2 ou 3 destes periodontopatógenos, ao final este número estava reduzido para 33%. Quando observada a profundidade média das bolsas o valor obtido antes do tratamento estava em 6,6 mm (\pm 0,4 mm) e

observou-se a redução para 2,2 mm (\pm 0,4 mm) em resposta ao tratamento ($p < 0,001$). Para se estabelecer o tratamento, cirúrgico ou não-cirúrgico, levou-se em consideração a profundidade das bolsas e a morfologia dentária. Não houve uso de quimioterápicos adicionais durante o tratamento. Houve uma melhora em 82% dos participantes relacionada à profundidade das bolsas (\leq 4 mm). A presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* ao início não foi associada com o resultado da terapia periodontal. Assim, os autores concluem que a presença das 3 espécies de periodontopatógenos tem pouco ou nenhum valor na predição de cura de bolsas periodontais.

A toxina do *A. actinomycetemcomitans* é reconhecidamente um importante fator de virulência na patogênese da periodontite localizada e outras formas de periodontite de início precoce. Algumas cepas altamente leucotóxicas de *A. actinomycetemcomitans* produzem 10 a 20 vezes mais leucotoxinas do que outras cepas menos leucotóxicas. A distribuição, clonalidade e a transmissão intrafamiliar deste periodontopatógeno altamente leucotóxico foi estudada por HARASZTHY et al.³⁸, 2000, para determinar a importância desta leucotoxina na patogênese da periodontite. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para diferenciar estas leucotoxinas mais tóxicas das cepas produtoras de leucotoxinas menos tóxicas em 1.023 *A. actinomycetemcomitans* frescos isolados e cepas de cultura própria. Estes foram obtidos de 146 indivíduos, incluindo 71 com periodontite localizada juvenil (LJP), 4 com periodontite de início precoce, 11 com periodontite juvenil localizada em prótese unitária, 41 com periodontite adulta e 19 periodontalmente normais. A análise da PCR de primers arbitrários (AP-PCR), de 25 indivíduos foi utilizada para determinar a distribuição intra-oral dos clones de *A. actinomycetemcomitans*. AP-PCR também foi utilizada para examinar a transmissão desta bactéria em 30 membros de 6 famílias. A clonalidade de 41 cepas de *A. actinomycetemcomitans* altamente leucotóxicas foi avaliada por ambos, AP-PCR e ribotipagem. A cepa altamente leucotóxica foi encontrada somente em indivíduos com periodontite juvenil localizada e de início precoce. 55% dos indivíduos LJP abrigavam estes microrganismos isolados. 73% dos Aa isolados nestes sujeitos foram altamente leucotóxicos. Estas bactérias infectaram indivíduos mais jovens (média de idade 13,95 anos, variando entre

5 a 28 anos) do que as menos tóxicas (média de 35,47 anos, entre 5 a 65 anos). A maioria dos indivíduos estava infectada com somente por um genótipo de *A. actinomycetemcomitans*. Entretanto, a PCR da placa dentária total e a subsequente análise de mais de 130 individuais, sugeriram que uma possível mudança nesta bactéria, extraperíodo, em uns poucos indivíduos que abrigavam cepas altamente e minimamente tóxicas. A análise da AP-PCR foi consistente com a transmissão intrafamiliares do *A. actinomycetemcomitans*. A ribotipagem e a AP-PCR confirmaram estudos prévios que reportavam o *A. actinomycetemcomitans* altamente leucotóxico consiste de um único tipo clônico. Assim, este estudo sugere que a periodontite juvenil localizada e outras formas de periodontite associada com o *A. actinomycetemcomitans* são, acima de tudo, associadas ao clone altamente leucotóxico desta bactéria.

P. gingivalis e *A. actinomycetemcomitans* são extremamente associados ao início e severidade da doença periodontal no adulto. Porém, pouco se sabe a respeito da colonização, e a resposta do hospedeiro, destes microrganismos em crianças. Assim, MORINUSHI et al.⁷¹, 2000, coletaram placa e soro de 40 crianças saudáveis, entre 2 a 18 anos. A saúde gengival foi avaliada pelo índice de doença periodontal (PDI), escores de sangramento papilar (BS) e índice modificado de inserção da margem papilar total (M-PMA). *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* nas amostras de placa foram detectados por slot immunoblotting (SIB). Os níveis sorológicos de anticorpos contra estes microrganismos foram avaliados utilizando-se ELISA. Mais de 60% das crianças apresentavam níveis detectáveis de *P. gingivalis* em sua placa. Aqueles que apresentaram níveis detectáveis encerraram mais inflamação gengival do que aqueles que não apresentaram; entretanto, estas diferenças foram significantes somente em crianças acima de 12 anos (PDI, SB). Em contraste, enquanto 75% das crianças demonstraram níveis detectáveis de *A. actinomycetemcomitans*, houve uma diferença significativa na inflamação gengival associada com a colonização em crianças de 3 a 7 anos de idade (PDI) e acima de 12 anos (M-PMA). Níveis sorológicos de anticorpos contra *P. gingivalis* estavam inversamente correlacionados com a inflamação em todas as faixas etárias, enquanto que a titulação para o *A. actinomycetemcomitans* estava positivamente correlacionada com a inflamação

gingival somente em crianças acima de 12 anos. Não foi encontrada relação significativa entre a presença de ambos, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, e anticorpos contra estes. Devido aos seus achados, os autores concluíram que as duas bactérias estudadas são prontamente detectadas logo aos 3 anos de idade, e sua presença está associada com o início e severidade da gengivite.

O objetivo do estudo de OKADA; HAYASHI; NAGASAKA⁸³, 2000, foi estudar a detecção da presença de *A. actinomycetemcomitans*, e *P. gingivalis* em amostras de placa de 104 crianças, coletadas de suas escovas dentais e utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). A variação da idade dos participantes foi entre 2 a 12 anos. 21, 73 e 10 crianças com, respectivamente, gengiva saudável, gengivite e periodontite foram selecionadas. As amostras de placa foram coletadas de todos os sítios dos dentes erupcionados utilizando-se uma escova dental estéril. A média de concentração de DNA recuperado da placa resultante da escovação foi aproximadamente 660 µg/mL, a qual era suficiente para realizar a PCR. Ambos, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, foram detectados na dentição decídua e mista. A prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos saudáveis foi 4,8%, e aqueles com gengivite e periodontite foi 6,8% e 20,0%, respectivamente, enquanto que a prevalência de *P. gingivalis* foi 4,8% em indivíduos saudáveis, 9,6% e 20,0% naqueles com gengivite e periodontite, respectivamente. Dessa forma, os exames realizados pelos pesquisadores, utilizando escovas dentais, indicaram que *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* estão raramente presentes na cavidade bucal de crianças saudáveis.

Para investigar o papel de vários supostos marcadores de risco clínico e microbiológico, um estudo longitudinal foi iniciado por TIMMERMAN et al.¹²⁰, 2000, com uma população jovem sem cuidado dentário regular. Em 1987 toda a população, entre 15 e 25 anos, de uma vila com aproximadamente 2.000 habitantes das Indonésia, foram examinados clínica e microbiologicamente. Um total de 167 indivíduos, de 255, foram reexaminados em 1994. Este artigo descreve as condições periodontais clínicas ao início (1987) e ao final do seguimento (1994), 7 anos após. Além disso, a relação

entre a progressão da doença e os dados clínicos e microbiológicos registrados no início também foi avaliada. Índice de placa (PI), sangramento à sondagem (BOP), profundidade da bolsa (PD), e perda de inserção (AL) foram anotados da face proximal de todos os dentes. O número de superfícies proximais dos dentes previstos no índice de Ramfjord, as quais continham cálculo subgingival também foram anotadas. No início, o dorso da língua, a gengiva vestibular da maxila, a saliva e a bolsa periodontal sangrante mais profunda sem perda clínica de inserção, tiveram amostras coletadas para exame microbiológico com microscopia de contraste de fase e imunofluorescência indireta. A média dos valores ao início e ao final foram PI: 1,01 e 1,15; BOP: 0,80 e 1,16; PD: 3,26mm e 3,32mm; AL: 0,33mm e 0,73mm, respectivamente. Todos os parâmetros, exceto PD demonstraram um aumento significativo neste período de 7 anos. A prevalência das bactérias estudadas, independente, do sítio amostrado foi: *A. actinomycetemcomitans* 53%, *P. gingivalis* 88%, *P. intermedia* 100%, espiroquetas 89% e microrganismos móveis 100%. Para toda a boca, a regressão logística demonstrou significativo odds ratio para a progressão da doença em idade (1,15), cálculo subgingival (1,20) e presença subgingival de *A. actinomycetemcomitans* (4,61). A presença de qualquer um dos microrganismos selecionados nas membranas mucosas não estava relacionada à doença. Para estudar os fatores locais que explicariam a atividade local da doença. Cada indivíduo foi caracterizado utilizando a bolsa amostrada, a qual era a mais profunda bolsa sangrante sem perda de inserção ao início, como um único local da resposta por paciente. Neste delineamento restrito, os principais fatores estatísticos associados com a doença foram a presença de microrganismos móveis e a contagem de placa. Em conclusão, os autores neste estudo identificaram 3 principais marcadores de risco para a progressão da doença periodontal em toda a boca: idade, quantidade de cálculo subgingival e presença subgingival de *A. actinomycetemcomitans*.

Para TAKAHASHI et al.¹¹⁷, 2001, a doença periodontal é uma complicação de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (T1DM), ainda que os mecanismos responsáveis por esta relação permaneçam incertos. O objetivo deste estudo foi examinar as manifestações orais e a prevalência de patógenos periodontais de amostras de placa subgingival e os níveis séricos de

anticorpos IgG contra estes patógenos em jovens japoneses com diabetes tipo I. Assim, 117 indivíduos japoneses T1DM (53 homens e 64 mulheres, com média de idade de 16 anos, desvio padrão $\pm 6,5$ anos) participaram deste estudo. Os indivíduos T1DM foram clinicamente assinalados em 3 grupos: 12 com periodontite, 32 com gengivite e 73 periodontalmente saudáveis. Testes microbiológicos para 4 periodontopatógenos, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *C. ochracea*, foram realizados utilizando o método da PCR baseado no RNA-ribossomo 16s. Os níveis séricos de anticorpos IgG contra 12 bactérias periodontais, incluindo as 4 espécies avaliadas pela PCR, foram medidas pelo ensaio ELISA. Em indivíduos T1DM, o grupo “periodontite” teve a mais longa média significativa de duração da diabetes e a maior porcentagem de indivíduos que abrigavam *P. gingivalis* e *P. intermedia*, do que o grupo “periodontalmente saudável”. Os níveis séricos de anticorpos IgG contra *P. gingivalis* foram significativamente elevados no grupo “periodontite” comparado com os grupos “gengivite” e “periodontalmente saudável”. De acordo com os autores, estes resultados indicam que indivíduos japoneses T1DM constituem um grupo de alto risco para doença periodontal, e ambos, infecção causada por *P. intermedia* e duração da T1DM, são fatores de risco para a progressão da periodontite em pacientes com T1DM.

Em uma população de indonésios privada de cuidado dentário regular, a progressão da doença periodontal experimentada entre o início (1987) e o acompanhamento (1994) foi investigada por TIMMERMAN et al.¹²¹, 2001, em relação à composição da microbiota subgengival. No início a idade variou de 15 a 25 anos. A avaliação clínica e microbiológica foi completa em 158 de 167 indivíduos acompanhados. Índice de placa (PI), profundidade de bolsa (PD), sangramento à sondagem (BOP), e perda de inserção (AL) foram anotados nas superfícies proximais de todos os dentes e o cálculo subgengival anotado somente nas superfícies proximais dos dentes previstos no índice de Ramfjord (número de sítios com cálculo subgengival: NSC). Uma mistura das amostras das bolsas mais profundas em cada quadrante foi avaliada utilizando técnicas de cultura microbiológica. Ao começo do estudo, a média de valores dos parâmetros clínicos foram AL=0,35, PI=1,01, BOP=0,80, PD=3,25 mm e NSC=5,85. Todos os parâmetros, exceto PD e NSC, demonstraram um

aumento significativo. Durante o acompanhamento, a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* foi de 40%, de *P. gingivalis* 67%, de *P. intermedia* 66%, de *F. nucleatum* 79%, de *B. forsythus* 16%, de *C. rectus* 4% e de *P. micros* 6%. Não foram encontradas diferenças nos parâmetros clínicos entre os grupos com ou sem estes microrganismos. Encontram 129 indivíduos com AL \geq 2 mm em um ou mais sítios. O teste de regressão logística demonstrou 3 significantes odds ratio para a periodontite progressiva: índice de placa (12,2), gênero (3,4) e *A. actinomycetemcomitans* (2,9). Em posse dos resultados retrospectivos deste estudo, sugeriram que a placa é o mais importante parâmetro relacionado à progressão da doença experimentada, e que a presença de *A. actinomycetemcomitans* pode estar associada com o aumento da chance desta progressão.

Poucas informações estão disponíveis sobre a infecção bacteriana periodontal na infância. KIMURA et al.⁴⁷, 2002, avaliaram a prevalência por idade de 10 supostos microrganismos periodontopatogênicos em crianças saudáveis utilizando o exame da PCR. Para tal, coletaram amostras de placa do sulco mesio-vestibular do primeiro ou segundo molar do quadrante superior direito de 144 crianças (2 a 13 anos, com 12 indivíduos de cada idade) que apresentavam pequena e suave inflamação periodontal. Utilizando primers específicos para *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. ochracea*, *C. sputigena* e *T. denticola*, uma amplificação por PCR foi realizada com o DNA genômico bacteriano das amostras de placa. Os resultados encontraram *C. rectus*, *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. ochracea* e *C. sputigena* em 50% das amostras para todas as idades, enquanto que *B. forsythus* e *P. intermedia* foi menos frequentemente detectado e *P. gingivalis* e *T. denticola* não foram encontrados. Em contraste, a porcentagem de *P. nigrescens* em indivíduos positivos aumentou com a idade na dentição decídua, e alcançou cerca de 50% aos 7 anos de idade e mais velhos. Análises baseadas nos indivíduos sugeriram que, o número de espécies bacterianas nas amostras de placa, aumentaram gradualmente com a idade até os 5 anos e atingiram um platô após o período de dentição mista. Concluíram assim que, a colonização de muitos periodontopatógenos pode ocorrer relativamente cedo na infância sem

sinais clínicos de doença periodontal, entretanto, a colonização por *P. gingivalis* e *T. denticola* não é detectada em criança saudáveis.

Utilizando-se métodos sorológicos e bioquímicos é muito difícil de identificar o *A. actinomycetemcomitans*, mas o genótipo é meio confiável de realizar a caracterização bacteriana e pode ser utilizado para determinar a sua identidade clonal. O objetivo de RUBY et al.⁹⁷, 2002, foi genotipar 13 ATCC cepas referências, representantes de 6 diferentes *Actinomyces ssp.* orais, utilizando “DNA fingerprinting” (CDF), PCR com primers arbitrários (AP-PCR), PCR com polimorfismos terminais analisados por restrição de fragmentos (PCR-RFLP). Analisando a CDF, BamHI, BstEII e SmaI, produziram um modelo de extração revelando características diferentes entre as espécies conhecidas de *Actinomyces ssp.*, com SmaI demonstrando uma resolução ótima. Amplicons gerados por AP-PCR com primer OPB-07 exibiram padrões de bandas que permitiram discriminar todas as cepas testadas. PCR-RFLP processada com MnlI geraram padrões de fragmentos que também caracterizaram a cepa referência. Em conjunto, os perfis genotípicos produzidos por CDF, AP-PCR e PCR-RFLP, permitiram a diferenciação de todas as 13 cepas de *Actinomyces* ATCC. A análise de CDF SmaI de 18 genoespécies clínicas isoladas de *A. naeslundii* catalase-positivo revelaram uma extensa diversidade genética entre as cepas. Por fim, sugerem que estas abordagens moleculares podem ser úteis na determinação genética da diversidade entre populações de *Actinomyces* orais.

O estudo de SIRINIAN et al.¹¹⁰, 2002, determinou os indicadores de risco para a colonização oral de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola* em 150 crianças e adolescentes, entre 4 a 16 anos, moradores de Los Angeles, Califórnia. 50 caucasianos, 50 hispânicos e 50 americanos de origem asiática completaram um questionário sobre características demográficas. Para determinar a presença de bactérias em saliva não estimulada, foi empregada uma PCR baseada na porção 16S rRNA. A análise de regressão logística, tipo step-wise, identificou variáveis úteis sobre a contagem salivar da presença de bactérias periodontopatogênicas. O *A. actinomycetemcomitans* ocorreu em 15%, *P. gingivalis* em 15%, *B. forsythus*

em 14% e *T. denticola* em 18% dos indivíduos. Dois ou mais patógenos foram detectados em 20% dos hispânicos e em 12% dos americanos de origem asiática, mas nenhum em qualquer caucasiano ($p = 0,0005$, teste chi quadrado). Entretanto, nenhum modelo multivariado estável, incluindo etnia, foi encontrado para múltiplos patógenos. O risco para abrigar qualquer patógeno aumentou com a extensão do intervalo de tempo da última visita ao dentista (odds ratio [OR], 4,46; intervalo de confiança [CI] de 95%, 1,83 a 12,21) e diminuiu com o aumento do nível de educação da mãe (OR, 0,258; CI 95%, 0,052 a 0,875). O risco de abrigar 2 ou mais patógenos periodontais diminuiu com o tempo em que os pais estavam residindo nos Estados Unidos (OR, 0,91; CI 95%, 0,901 a 0,992). O risco de abrigar *A. actinomycetemcomitans* diminuiu com os anos em que os pais estavam residindo nos Estados Unidos (OR, 0,91; CI 95%, 0,86 a 0,95), e diminuiu com o aumento do nível de renda do pai (OR, 0,201; CI 95%, 0,038 a 0,948). Garotas tinham maior risco para acolher *P. gingivalis* (OR, 2,55; CI 95%, 1,02 a 7,03), mas um menor risco de portar *T. denticola* (OR, 0,42; CI 95%, 0,17 a 0,98). Assim, o estudo demonstrou que a ocorrência de bactérias periodontopatogênicas em indivíduos jovens estava relacionada ao tempo em que os pais residiam nos Estados Unidos, nível de educação da mãe, tempo passado da última visita ao dentista e ao sexo, mas não aparentemente à etnia por si só.

Para GAFAN et al.²⁷, 2004, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, e *T. forsythensis* têm sido implicados como os principais agentes etiológicos da doença periodontal. O propósito de seu trabalho foi estimar a prevalência destes organismos na placa dentária de crianças sem gengivite (grupo 1; $n = 65$), e de crianças com gengivite (grupo 2; $n = 53$). O DNA extraído da placa foi submetido à PCR 16S rRNA utilizando ambos primers, universal e espécie-específico. Os resultados foram para o grupo 1: *P. gingivalis* 49%, *A. actinomycetemcomitans* 55%, *T. forsythensis* 65%; para o grupo 2: *P. gingivalis* 47%, *A. actinomycetemcomitans* 59%, *T. forsythensis* 45%. *T. forsythensis* foi detectada mais frequentemente em crianças sem gengivite do que aquelas que apresentavam gengivite ($p = 0,03$). Não houve diferença significativa entre os dois grupos com respeito à presença de *P. gingivalis* ou *A. actinomycetemcomitans* ($p > 0,05$). A análise de regressão logística revelou

que a probabilidade do paciente apresentar gengivite era 2,3 vezes maior do que na ausência de *T. forsythensis*. Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os 3 patógenos podem ser detectados na placa dentária de crianças saudáveis e com gengivite e que a *T. forsythensis* está associada com a placa dentária em sítios onde não está presente a gengivite.

Para estudar a associação entre as complicações crônicas da diabetes mellitus, tipo I (T1DM) e tipo II (T2DM), dentre elas a doença periodontal e seus parâmetros clínicos e microbiológicos, CAMPUS et al.¹³, 2005, delinearam um estudo (caso-controle) com 212 indivíduos, 72 T2DM com idade média de 61,0±11 anos e 141 não diabéticos (controle) com boa saúde geral e média de idade de 59,1±9,2 anos. Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico-periodontal para profundidade de sondagem, nível de inserção, presença de cálculo, sangramento à sondagem, e avaliação do índice de placa. Amostras de placa subgengival foram obtidas para *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythensis*, identificadas utilizando PCR multiplex. Os resultados dos pacientes T2DM demonstraram um número significativo menor de dentes presentes ($p = 0,002$); um aumento significativo nas sondagens com mais de 4 mm de profundidade, assim como na porcentagem de bolsas com mais de 4 mm ($p = 0,04$ e $p = 0,05$, respectivamente). Havia também um aumento significativo para a periodontite ($p = 0,046$), para o sangramento à sondagem ($p = 0,02$) e para o índice de placa ($p = 0,01$). Uma associação significativa com diabetes foi detectada para o índice de placa ($\chi_2 = 4,46$, $p < 0,05$) e sangramento à sondagem ($\chi_2 = 3,60$, $p < 0,05$). Em relação à prevalência de bactérias, uma associação positiva foi anotada para *P. gingivalis* ($\chi_2 = 2,80$, $p < 0,05$) e *T. forsythensis* ($\chi_2 = 3,87$, $p < 0,05$). A presença de placa foi positivamente associada com o evento (diabetes) e com prevalência de *P. gingivalis* e *T. forsythensis*. Os resultados demonstrados permitiram aos autores concluir que pacientes T2DM são mais susceptíveis a uma doença periodontal mais severa.

TAMURA et al.¹⁸, 2006, analisaram a distribuição de 10 espécies de bactérias periodontais (*P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *P.*

nigrescens, *C. rectus*, *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. ochracea*, *C. sputigena* e *T. denticola*) em crianças. Compararam a sua distribuição nestas crianças e suas mães, com atenção especial às 3 bactérias da espécie conhecida como “complexo vermelho” (*P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*), cuja presença tinha sido demonstrada estar associada às condições relacionadas à doença periodontal. 113 pares crianças-mães foram aleatoriamente selecionados a partir de pacientes tratados na clínica odontopediátrica do Hospital de Osaka. Amostras de saliva foram retiradas na segunda visita, previamente à instrução de escovação dentária. DNA genômico foi extraído de cada amostra de saliva e ensaiado segundo a reação em cadeia da polimerase (PCR), com kits de primers específicos para cada espécie. O *A. actinomycetemcomitans* foi a espécie mais frequentemente detectada nas mães, seguido pelo *C. sputigena*, *P. intermedia* e *T. forsythensis*, enquanto que *C. sputigena* tinha a maior taxa de detecção, seguido pelo *A. actinomycetemcomitans* e *T. denticola* nas crianças. A taxa de detecção nas espécies do “complexo vermelho”, em crianças as quais a mãe possuía as mesmas espécies, foi significativamente maior do que naquelas cujas mães não as apresentavam. Em posse destes resultados, os autores concluíram indicando a correlação entre a presença de bactérias periodontais em crianças e suas mães, enquanto que a presença de bactérias do “complexo vermelho” em crianças estava altamente associada com as de suas mães.

Com o objetivo de avaliar a prevalência de patógenos periodontais (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *T. denticola*), na saliva de crianças com dentição mista em dois intervalos de tempo diferentes e assim, correlacionar estes achados com parâmetros clínicos de saúde gengival, SAKAI et al.¹⁰⁰, 2007, utilizaram a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar esta prevalência em 64 crianças em 2003, e 60 crianças em 2004. A saúde gengival foi avaliada pelo Índice Gengival. Os resultados demonstraram que 62 (96,9%) e 50 (83,3%) apresentaram pequena inflamação gengival, enquanto que, 2 (3,1%) e 10 (16,7%) apresentavam valores moderados em 2003 e 2004, respectivamente. A maioria das crianças (81,3% em 2003 e 73,3% em 2004) tinha níveis detectáveis de ao menos uma bactéria. A prevalência encontrada foi de 4,7% e 1,7% para *A. actinomycetemcomitans*,

6,3% e 8,3% para *P. gingivalis*, 23,4% e 48,3% para *P. nigrescens*, 71,9% e 50% para *T. denticola* ($p < 0,05$) em 2003 e 2004, respectivamente. Não foi encontrada diferença significativa entre o Índice Gengival e a presença destas bactérias ou a combinação de diferentes espécies. Os resultados permitiram os autores a concluir que uma alta porcentagem de crianças abrigava, ao menos um, os supostos periodontopatógenos na saliva, porém apresentavam condições periodontais saudáveis.

2.4 Metronidazol

O estudo de NEWMAN et al.⁷⁵, 1984, teve a intenção de desenvolver métodos práticos de controle da periodontite crônica que não dependessem estritamente da limpeza interdental pelo paciente. Para ser viável e compatível com uma situação real na prática diária, o sistema deveria consistir de componentes profissionais e cuidados caseiros. Foram selecionados pacientes com periodontite crônica, mas sem outras complicações, tais como doenças sistêmicas, terapia recente com antimicrobianos ou traumatismos oclusais. Estes indivíduos receberam raspagem completa, alisamento radicular e instrução de higiene no método de escovação de Bass, utilizando escova multitufo e creme dental a base de fluoreto de sódio, porém sem ênfase na limpeza interdental. Dois grupos foram formados, um recebeu além da orientação de higiene mecânica, baixas doses de metronidazol (0,5%), e outro altas doses (40%), localmente nas bolsas periodontais uma vez por semana durante 4 semanas. As doses mais baixas foram oferecidas na forma de solução por meio de um fino tubo de diálise. As doses altas foram em forma de pó incorporado em resina acrílica. Os índices de placa, sangramento no sulco, profundidade de sondagem e retração gengival foram monitorados durante este período e por mais 8 semanas. Ambos os grupos demonstraram, significativamente, reduções na placa subgengival e inflamação periodontal, que foram mantidos durante as 8 semanas subseqüentes ao período de terapia química. As reduções no índice de sangramento gengival foram maiores para o grupo metronidazol 40%. Assim, concluíram que o metronidazol localmente, mesmo na forma de 0,5%, tem uma papel positivo no controle da periodontite crônica.

Em seu trabalho, GENCO³⁰, 1991, afirma que as doenças periodontais são infecções bacterianas e que uma boa alternativa para o tratamento e prevenção desta, pode ser obtida através do uso de antimicrobianos. Assim sendo, formas refratárias de doença periodontal destrutiva tem apresentado uma resposta satisfatória ao uso de antibióticos sistêmicos, utilizados como complemento às terapias convencionais, uma vez que estes antimicrobianos têm objetivo de eliminar ou suprimir as bactérias patogênicas subgengivais. O autor ainda sugere que o uso destes agentes por deposição subgengival ou através de irrigação durante a terapia periodontal, pode representar um excelente auxiliar anti-infeccioso no controle das doenças periodontais, quando associados ao debridamento cirúrgico ultra-sônico.

HOWELL⁴⁰, 1991, acredita ser a designação “doença periodontal”, um termo muito amplo, que abrangente um número variado de outras doenças infecciosas, as quais relacionam-se e envolvem todas as estruturas de suporte do elemento dentário. Porém, é fato que estas afecções estão, invariavelmente, envolvidas com a presença de grupos específicos de microrganismos, e esta evidência tem norteado os clínicos a conduzir os tratamentos de forma a suprimirem ou eliminarem estes patógenos periodontais. Inicialmente preferidas no passado para o controle desta doença multifatorial, a intervenção cirúrgica e a remoção mecânica, atualmente, devidos aos grandes avanços no desenvolvimento de drogas quimioterápicas, tem-se associado crescentemente a estes agentes com o intuito de suprimir a flora patogênica. Em adição, o uso de agentes antimetabólicos para modular a resposta inflamatória do hospedeiro ao acúmulo de placa dentária também tem aumentado. Posto isto, o autor recomenda que ambos os tipos de agentes quimioterápicos possam ser utilizados, isoladamente ou combinados com a terapia periodontal tradicional, com o objetivo de obterem-se melhoras clínicas predizíveis e eficientes.

STOLTZE¹¹⁶, 1992, monitorou a concentração de metronidazol liberado no fluido crevicular gengival (FCG) após a aplicação de metronidazol em gel a 25% em bolsas periodontais inflamadas de 12 pacientes participantes deste estudo, onde todos estes apresentavam doença periodontal. Para aplicação deste gel, por meio de uma seringa, diretamente nas bolsas

periodontais, foram selecionados 10 dentes que apresentavam profundidade de sondagem de ao menos 5 mm. Para a coleta das amostras de fluido crevicular foi utilizado o “Periopaper” e estas foram obtidas antes da aplicação do gel e após 4, 8, 12, 24 e 36 horas. Para cada avaliação, dois dentes eram selecionados para coleta de material em volume suficiente de fluido para ser analisado por um “Periotron” calibrado, que aferia o FCG retirado dos sítios. Para processamento das amostras coletadas utilizou-se a cromatografia líquida de alto desempenho para determinar a quantidade de metronidazol presente no fluido. Estudos anteriores reportaram que a mínima concentração inibitória requerida para inibir o crescimento de 50% dos microrganismos (MIC50) para periodontopatógenos anaeróbios susceptíveis ao metronidazol seria inferior a 1 µg/mL. Neste presente estudo, a concentração obtida foi maior do que 1 µg/mL em todas as amostras após 4 e 8 horas, em 92% após 12 horas, em 50% após 24 horas e em 8% após 36 horas. Em posse destes resultados, os autores observaram que a concentração de metronidazol nas bolsas foi acima da MIC50 para os periodontopatógenos susceptíveis, até 24 horas após a aplicação de gel de metronidazol 25%, o que sugere ser este antimicrobiano efetivo no tratamento da doença periodontal.

Um trabalho conduzido por STOLTZE; STELLFELD¹¹⁵, 1992, observou a absorção sistêmica de metronidazol após o paciente receber uma aplicação tópica deste medicamento em forma de gel a 25%, diretamente nas bolsas periodontais inflamadas, em 14 indivíduos que apresentavam doença periodontal. O critério de inclusão para este estudo observava que o paciente deveria apresentar um mínimo de 10 dentes com profundidade de sondagem de 5 mm ou mais, e este recebeu a aplicação do gel em todas as bolsas periodontais. Para proceder ao cálculo da quantidade de metronidazol depositado nas bolsas, havia o cuidado de remover o excesso de gel aplicado. Dessa forma, as amostras de sangue para análise do metronidazol no plasma foram coletadas antes e 72 horas após a aplicação. Com o intuito de determinar a biodisponibilidade do metronidazol administrado em gel, foi administrada aos pacientes, posteriormente, uma dose intravascular de 100 mg de metronidazol. O metronidazol foi quantificado através de cromatografia de alta performance (HPLC). A dose média de metronidazol em gel registrada foi

de 55 mg (desvio padrão de 24 mg, intervalo de 29-103 mg). Observando que havia um excesso de gel, e este correspondia cerca de 60% da quantidade aplicada, e que esta, sob condições clínicas normais, eventualmente poderia ser deglutida, os autores sugerem que a carga sistêmica após uma aplicação de gel dental de metronidazol será ainda menor do que um comprimido de metronidazol de 250mg. Por fim, se o pico das concentrações no plasma variou de 223 a 1303 ng/mL (média de 581ng/mL, desvio padrão de 320 ng/mL) e foi obtido de 2 a 8 horas (média de 4,4 horas), a biodisponibilidade média de gel dental de metronidazol foi de 71%.

AINAMO et al.¹, 1992, compararam um gel dental de metronidazol 25% à raspagem subgengival, para o tratamento da periodontite adulta. O estudo utilizou 206 pacientes de 9 centros diferentes, e foram registrados a profundidade (PS) e sangramento à sondagem (SS), antes do tratamento, com 2, 6, 12, 18 e 24 semanas após este. Para participar deste trabalho os pacientes deveriam apresentar pelo menos um dente em cada quadrante com PS de 5 mm ou mais. Os grupos testes deveriam receber 2 aplicações de gel dental (dias 0 e 7) em quadrantes selecionados aleatoriamente, e 2 sessões de raspagem subgengival (1 quadrante no dia 0, e 1 quadrante no dia 7). Não foram fornecidas instruções para higiene oral previamente, somente após 2 semanas do término do tratamento. A PS média e a média de SS foram obtidas para todos os sítios com PS inicial de 5 mm ou mais. Para todas as leituras foram determinadas a PS e o SS dos mesmos sítios. Dessa forma, os valores médios para PS foram 5,9 mm antes da aplicação do gel e de 5,8 mm antes da raspagem ($p = 0,31$). Para o SS encontrou-se 88% para ambos os grupos. Após 24 semanas do tratamento, a PS e o SS apresentaram-se estatisticamente significativamente menores para ambos os grupos e para ambos os parâmetros ($p < 0,01$). A PS foi reduzida em 1,3 mm após a aplicação do gel e 1,5 mm após a raspagem, assim como a SS foi reduzida em 32% e 39%, respectivamente. Apesar da diferença entre os tratamentos apresentar-se estatisticamente significativa, os autores concluem que não há uma importância clínica relevante.

Para LOESCH; GROSSMAN; GIORDANO⁵⁷, 1993, o fato de não ser observado pelo paciente a correta prescrição dos medicamentos, pode ser prejudicial ao sucesso do tratamento de infecções periodontais com agentes antimicrobianos administrados de forma sistêmica, levando inclusive à confusão por parte do clínico, em relação a respeito da verdadeira eficiência do medicamento. Utilizando o metronidazol, um reconhecido agente para o tratamento de infecções periodontais anaeróbias, em particular com ação *in vitro* sobre espiroquetas, os autores investigaram a eficiência deste medicamento vinculada ao correto uso, por parte do paciente, nos tratamentos das doenças periodontais. Para este estudo foram selecionados pacientes que apresentavam altos níveis de espiroquetas, os quais foram estimados com o seguinte critério: removida a placa dentária de sítios que apresentavam doença periodontal, esta amostra deveria possuir ao menos 20% deste microrganismo. A estes pacientes foi solicitado que utilizassem metronidazol 500 mg, 2 vezes ao dia, sob supervisão. Todos os indivíduos experimentaram uma redução expressiva ou mesmo a supressão, rapidamente, destes patógenos, durante o intervalo de tempo em que o metronidazol foi detectável na saliva. Em posse destes dados, os autores utilizaram estes resultados para avaliar quais pacientes haviam seguido fielmente as orientações de uso do antimicrobiano em um segundo estudo clínico duplo-cego, o qual apresentava um dos grupos sem a supervisão do uso do medicamento. De um total de 18 indivíduos participantes, 10 (56%) destes seguiram as orientações de forma correta ao utilizar o metronidazol, e os resultados apontaram que estes pacientes experimentaram um benefício significativamente maior do metronidazol, comparados ao restante que não seguiu a prescrição corretamente. No rol dos pacientes que obedeceram as recomendações foi observada uma redução das necessidades cirúrgicas de cerca de 8,3 elementos dentários por paciente obediente comparados a dentes por paciente não obediente. Ainda para autenticar a veracidade dos resultados foi realizado um teste de hidrólise de peptídeo sintético (Benzoil-DL-arginina-naftil-amida, também conhecido como BANA), este um produto presente na placa quando esta é colonizada por um ou mais dos seguintes periodontopatógenos: *P. gingivalis*, *T. denticola* ou *B. forsythus*. Com isto, os autores concluem ressaltando que em estudos clínicos onde há administração de drogas

sistêmicas, deve-se evitar o viés que pode ocorrer em relação à cooperação do paciente.

SAXEN; ASIKAINEN¹⁰⁴, 1993, realizaram um estudo onde foi comparado o uso de metronidazol e tetraciclina quando utilizados como coadjuvantes na terapia da periodontite juvenil localizada (PJV), para tal foram selecionados 27 indivíduos portadores de PVJ que se apresentavam positivos para *A. actinomycetemcomitans*. O protocolo de tratamento preconizado foi a raspagem e alisamento radicular, controle de higiene oral e cirurgia e, quando indicado, cirurgia periodontal. 3 grupos com as mesmas características foram formados aleatoriamente, onde o grupo I recebeu 200mg de metronidazol, 3 vezes ao dia, durante 10 dias; o grupo II recebeu 250mg de tetraciclina, 4 vezes ao dia, por 12 dias; e o grupo controle não recebeu terapia antimicrobiana adicional. Em todos os participantes foram selecionados 4 sítios teste, tendo como critério de inclusão a maior perda óssea apresentada, comprovada através de radiografias, ressaltando que houve necessidade de terapia cirúrgica em 6 pacientes. Registrou-se inicialmente e após 6 e 18 meses do término do tratamento, os índices gengival, de sangramento gengival à sondagem (SG), profundidade de sondagem (PS), supuração, perda óssea radiográfica, além do cultivo seletivo de amostras subgengivais para o *A. actinomycetemcomitans*. Também foram registrados todos os sítios que apresentavam SG e PS = 4 mm para toda dentição. Os resultados evidenciados ao final do trabalho, demonstravam haver redução no nível de *A. actinomycetemcomitans* em todos os sítios testes, porém, somente o grupo que utilizou o metronidazol apresentou redução em todos os seus sítios. Para o grupo tetraciclina foi observada a redução de 16 sítios, de um total de 26, referente a 4 pacientes e, para o grupo controle, foi observada a redução em 19 de 26 sítios (6 pacientes). Em relação aos demais parâmetros clínicos, foi verificada melhora em todos os grupos, assim, em posse destes dados, os autores concluíram que o metronidazol foi o medicamento que melhor reduziu o periodontopatógeno e que esta supressão parece produzir melhores resultados clínicos.

GREENSTEIN³¹, 1993, em seu trabalho, aponta as características do metronidazol, referindo-se a este como um agente que pode melhorar a saúde periodontal. Em sua revisão da farmacologia, sugere segurança no uso deste medicamento, na dosagem recomendada, ao relatar que esta apresenta baixos riscos de efeitos colaterais aos seres humanos, no que se refere à indução de toxicidade aguda, mutagenicidade ou câncer. Observa, no entanto, que o uso do metronidazol rotineiramente, em algumas situações clínicas, nem sempre contribui com o alisamento radicular, porém ressalta que a antibioticoterapia complementar pode ser desejável, aplicada diretamente nos sítios, quando este alisamento radicular é comprometido pela profundidade da bolsa periodontal, ou quando não temos respostas satisfatórias à terapia convencional.

Para a ANTIBIOTIC...⁵, 1994, a doença periodontal é a maior causa de perdas dentárias, à medida que a inflamação causada pela placa dentária afeta as estruturas de suporte dos dentes. O tratamento convencional envolve a remoção mecânica da placa calcificada, combinada com uma meticulosa higiene oral pelo paciente. Uma abordagem mais completa envolve a aplicação de drogas antimicrobianas localmente ao tecido gengival enfermo após o debridamento, dentre elas estão sendo muito utilizadas a minociclina em gel a 2% (Dentomycin-Lederle) e o metronidazol em gel a 25% (Elyzol-Dumex), para o tratamento de pacientes com doença periodontal. Segundo a publicação, estes tratamentos representam um avanço na terapia convencional.

Para melhor avaliar a distribuição periférica da espiramicina combinada com o metronidazol (Rodogyl), observando-a no fluido gengival, saliva e no sangue, ROTZETTER et al.⁹⁵, 1994, realizaram um experimento administrando uma dose única a 12 voluntários saudáveis e, repetidas doses ao longo de 15 dias em 4 pacientes com periodontite severa recorrente. A análise dos 2 antibióticos foi realizada em intervalos regulares durante o período de 24 horas imediatamente seguintes à administração aos voluntários e após o primeiro e 15º dia de administração repetida aos pacientes. Os resultados observados demonstraram que havia concentrações de espiramicina/metronidazol no fluido gengival em uma quantidade maior do que a necessária para inibir o crescimento de periodontopatógenos. Em relação à

espiramicina, este esteve presente em maiores concentrações no fluido gengival quando comparada ao sangue. O mesmo não foi observado para o metronidazol, administrado concomitantemente, apresentando concentrações semelhantes em ambos. Estas concentrações elevadas demonstradas pelos resultados prosseguiram por um longo período de tempo e, face a estes, os autores sugerem que esta medicação combinada desta forma, tem uma boa perspectiva no tratamento de casos severos de periodontite.

Para avaliar os efeitos clínicos e microbiológicos do uso associado do metronidazol (250 mg) + amoxicilina (375 mg) e o tratamento mecânico, PAVICIC et al.⁸⁷, 1994, avaliaram 48 indivíduos com doença periodontal relacionada ao *A. actinomycetemcomitans*. Foram anotados os valores iniciais e após 3 e 24 meses do término do tratamento, para a profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, índice de placa e índice de sangramento. Ao final 47 pacientes apresentaram-se negativos para a presença da bactéria, quando removidas amostras das membranas mucosas, área tonsilar e saliva. As avaliações clínicas demonstraram que houve redução em todos os parâmetros entre o início e 3 meses após o tratamento, e esta melhora continuou sendo observada entre 3 e 24 meses. Com os dados obtidos os autores concluíram que o debridamento mecânico e a terapia com metronidazol mais amoxicilina é muito eficiente na supressão do *A. actinomycetemcomitans* abaixo dos níveis cultiváveis por um longo período de tempo, sugerindo a eliminação do microrganismo, e que a uma nova colonização por esta bactéria parece ser pouco provável. A eliminação do *A. actinomycetemcomitans* é concomitante com uma melhora posterior do status periodontal dos pacientes, até 24 meses após o tratamento ativo.

Um trabalho de FRANDSEN et al.²⁶, 1994, investigou o papel da colonização bacteriana na reparação de defeitos periodontais subsequente ao uso de um gel de metronidazol tópico (25%, 250mg/g) como coadjuvante no tratamento para regeneração tecidual por meio de membranas de politetrafluoroetileno. O estudo contou com 12 indivíduos, os quais se apresentavam cada um com um par de defeitos semelhantes. O grupo teste recebeu o tratamento com a membrana mais o gel de metronidazol e o grupo

controle foi tratado exclusivamente com a membrana. Um acompanhamento de 30 semanas após a remoção da membrana, demonstrou que havia um ganho médio no nível de inserção de 92% em relação à sondagem inicial para o grupo teste e de 50% para os defeitos do grupo controle ($p = 0,001$). Com relação ao número médio de bactérias cultiváveis, observou-se no grupo teste uma diminuição de 1,2 milhões na avaliação inicial, antes do procedimento cirúrgico, para 300 mil após uma semana da cirurgia ($p = 0,02$), enquanto que no grupo controle foi observado um aumento destes valores. Da mesma forma, foi observada uma diminuição de bastonetes anaeróbios Gram-negativos preto-pigmentados passada uma semana da cirurgia no grupo teste (0,004%) em comparação ao grupo controle (3,5%) ($p = 0,02$). Passadas 2 semanas da inserção da membrana, e em todas as leituras posteriores, não foi observada diferença nos padrões microbiológicos em ambos os grupos. Estes resultados levaram os autores a concluir que a influência do metronidazol no resultado final do tratamento parece ter sido confinada a fase de regeneração inicial. Em adição, embora tenham apresentado bons resultados clínicos no grupo teste, as membranas dos dois grupos, teste e controle, apresentavam-se bastante colonizadas por bactérias no período da remoção. Por fim, os autores sugerem que a obtenção do máximo de regeneração periodontal com formação de osso, está relacionada à redução da colonização microbiana da área comprometida e, dessa forma, as pesquisas posteriores deveriam ser conduzidas nesta linha de pensamento.

Com o objetivo de avaliar clinicamente os efeitos do metronidazol (5%) aplicado por meio de um dispositivo de colágeno em bolsas periodontais com mais de 5 mm, HITZIG et al.³⁹, 1994, associaram este medicamento à raspagem radicular, sem fornecer informações adicionais sobre higiene bucal ao paciente, mantendo a rotina que este usualmente utilizava para sua higienização. 28 pacientes foram avaliados de acordo com os seguintes parâmetros, profundidade da bolsa, nível de inserção, sangramento à sondagem, índice gengival e índice de placa. As leituras foram realizadas antes do início da terapia e após 15, 30 e 90 dias. Com a análise dos resultados obtidos foi possível observar que houve redução de profundidade da bolsa, sangramento à sondagem e índice gengival em ambas as terapias propostas,

alisamento radicular e terapia com metronidazol, no entanto, houve uma diferença estatisticamente significativa em favor do metronidazol. Face a estes resultados, os autores concluíram que o metronidazol tópico proporciona um tratamento suplementar eficiente na periodontite avançada.

Em seu trabalho HANCOCK; NEWEL³⁷, 1994, relatam que substâncias antimicrobianas constituem meios auxiliares eficazes no controle de microorganismos que desempenham importante papel no desenvolvimento da doença periodontal. Assim, recomendam seu uso nos mais variados veículos de aplicação que incluem enxaguatórios orais, dentifrícios, aplicação tópica e administração sistêmica. No entanto, enfatizam que a escolha correta dos agentes e os métodos de aplicação deve ser criteriosa, devendo levar em consideração a sua ação contra os patógenos presentes na infecção a ser tratada. Necessitamos ainda ter a certeza de que o medicamento de escolha atinja o local de ação na concentração apropriada, permanecendo neste sítio pelo tempo suficiente para debelar a doença. Por fim, sugerem que uma avaliação clínica cuidadosa e um diagnóstico preciso, associado ao uso de um antibiótico adicional, podem ser de grande valia no tratamento periodontal.

Com o objetivo de avaliar o efeito da cicatrização do periodonto após a regeneração tecidual guiada (RTG) realizada com o uso associado de metronidazol em gel topicamente, SANDER et al.¹⁰³, 1994, realizaram um trabalho utilizando 12 indivíduos que apresentavam um par de defeitos periodontais verticais com características semelhantes de tamanho e outras particularidades. Para um delineamento que permitisse dupla comparação, dois grupos foram formados; um grupo teste que recebeu o tratamento para os defeitos através da RTG utilizando-se membranas de politetrafluoroetileno expandida (ePTFE) associada à aplicação tópica de metronidazol gel, e um grupo controle que recebeu o mesmo protocolo de tratamento, porém, não houve a combinação da terapia cirúrgica com o antimicrobiano. Os resultados registrados durante o primeiro mês de implantação da membrana, não apontavam diferença estatisticamente significativa para a inflamação marginal observada tanto para superfície teste quanto para a superfície controle. No entanto, após remoção da membrana, que ocorreu em 6 semanas, o ganho

médio do nível de inserção medido pela sondagem, comparado à profundidade inicial do defeito, foi de 92% no grupo teste e 50% no grupo controle ($p = 0,01$). Para outros parâmetros avaliados como placa, sangramento à sondagem, redução na profundidade da bolsa, ganho de altura de osso ou recessão da margem gengival não se observou diferença estatisticamente significativa entre os sítios estudados. Por meio destes dados os autores chegaram à conclusão que o uso de metronidazol em gel localmente pode apresentar resultados favoráveis relacionados à cicatrização de defeitos ósseos verticais que foram tratados através da regeneração tecidual guiada.

Ao estudar dois trabalhos duplo-cego prévios ao seu artigo, LOESCH; GIORDANO⁵⁸, 1994, observaram que o uso de metronidazol durante uma semana, associado à raspagem e aplainamento radicular, pode apresentar uma redução significativa na necessidade de cirurgia periodontal, levando em consideração o número de dentes envolvidos, quando comparado ao mesmo protocolo substituindo o antibiótico por um placebo (controle). Em um dos estudos os comprimidos de metronidazol ou placebo foram tomados no início dos procedimentos de debridamento, enquanto que no outro, os comprimidos foram tomados após todo o debridamento ter sido completado. Os autores em posse dos resultados de ambos os estudos, através da combinação destes dados e utilizando uma metodologia estatística através da análise de variância, observaram os efeitos da medicação utilizada e apontaram uma redução média nas necessidades cirúrgicas de 7,1 elementos dentários nos pacientes que utilizaram o metronidazol, comparado a 2,4 elementos nos grupo controle ($p = 0,004$). Um outro parâmetro avaliado foi a profundidade das bolsas, no entanto, não houve melhoras adicionais associadas com o uso do antimicrobiano após o debridamento.

Para BHASKAR¹⁰, 1995, o acompanhamento (controle) dos tecidos gengivais ou terapia periodontal não-cirúrgica, baseado nos conceitos atuais de placa dentária e na natureza da progressão da doença periodontal, pode representar uma ótima opção para o tratamento da periodontite quando, por qualquer razão, o paciente prefere uma terapia não cirúrgica. Um outro atrativo deste tipo de tratamento é a possibilidade de ser feito pelo clínico geral ou

mesmo por uma THD. Conduzido de forma adequada, utilizando-se ultra-som, antibióticos e soluções para irrigação profissional e caseira, associado aos retornos regulares para acompanhamento do cirurgião-dentista, este tipo de tratamento é notadamente capaz de melhorar a saúde periodontal destes pacientes.

O *A. actinomycetemcomitans* é uma anaeróbia facultativa que apresenta uma moderada susceptibilidade ao metronidazol e este estudo de PAVICIC et al.⁸⁸, 1995, foi conduzido para identificar os fatores implicados neste aspecto. Esta bactéria aparenta ser 2 a 4 vezes menos susceptível ao metronidazol quando cresce com um suplemento de ar de 5% de CO₂ do que quando o faz em condições de anaerobiose. Piruvato unido à ferredoxina com atividade oxidorrredutase estava ausente em cada cepa que exibiu atividade nitrorredutase, a qual correspondeu diretamente com a ingestão de metronidazol e à susceptibilidade à droga em condições anaeróbicas, mas não suplementado com 5% de CO₂. Dessa forma, concluíram que a atividade nitrorredutase, conseqüentemente, aparentou ser a responsável pela susceptibilidade do *A. actinomycetemcomitans* ao metronidazol.

Com o objetivo de avaliar os efeitos de um gel de metronidazol 25% comparado com a raspagem subgingival, STELZEL; FLORES-DE-JACOBY¹¹⁴, 1996, observaram 30 indivíduos participantes de um programa de retorno, delineado para este estudo de forma aleatória e definido por hemiarco. Foi observada a profundidades de sondagem das bolsas (PB) e o sangramento a sondagem (SS), medidos antes do tratamento e após 2, 12 e 24 semanas do término do tratamento. Em adição, foram observadas amostras de placa subgingival retiradas de todos os sítios mesiais, através de microscopia de campo escuro. Também foi determinado que todos os pacientes deveriam possuir ao menos um elemento dentário, por quadrante, que apresentasse PB \geq 5 mm, com sangramento a sondagem ao início do estudo. O protocolo de tratamento consistia da aplicação do gel teste em 2 quadrantes selecionados aleatoriamente em 0 e 7 dias, e na raspagem dos quadrantes remanescentes. Não havia nenhuma orientação de higiene adicional até o 21º quando esta foi realizada. Os resultados foram avaliados calculando-se a PB média e a

freqüência média de SS em todos os sítios de 5 mm ou mais inicialmente e, em todos os exames de retorno, o mesmo sítio era reavaliado. Após a aplicação dos testes estatísticos os resultados revelaram que os dois tratamentos avaliados apresentaram-se satisfatórios para a redução da PB e SS por um período de 6 meses. Ao final do período de avaliação ficou constatado que houve uma redução média de 1,3 mm para o uso do gel de metronidazol 25% e de 1,5 mm para a raspagem subgengival, enquanto que o SS foi reduzido em 35% e 42% respectivamente, porém não havia evidência estatisticamente significativa de diferença entre os dois protocolos. Para a análise microscópica, a avaliação por campo escuro revelou a presença de uma flora mais equilibrada após ambas as terapias, também por um espaço de 6 meses. Em posse destes dados, os autores inferem que o uso do quimioterápico, na concentração utilizada, tem o mesmo desempenho para os parâmetros clínicos e microbiológicos estudados, quando comparado à raspagem subgengival.

LOESCH et al.⁵⁹, 1996, estudando a doença periodontal avançada, avaliaram 94 pacientes de forma aleatória, utilizando um delineamento de estudo duplo-cego, com o intuito de observar se o uso por um tempo limitado de antimicrobianos sistêmicos (metronidazol, doxiciclina) e antimicrobianos de ação tópica (metronidazol, clorexidina) poderia evitar tratamento cirúrgico. Os resultados observados demonstraram que houve uma redução de 93% na necessidade de cirurgia periodontal em dentes individualizados e uma redução de 81% na necessidade de extrações dentárias. De 783 elementos dentários avaliados, 93 necessitaram de cirurgia ou exodontia. De todos os pacientes avaliados, 81% tiveram sua indicação de tratamento cirúrgico suspensa e mantiveram-se em controle sem a necessidade desta. Em função destes resultados os autores concluem sugerindo que o modelo de tratamento proposto, baseado no diagnóstico e tratamento de infecções anaeróbias, poderá resultar em sucesso, constituindo uma alternativa àqueles pacientes no quais há recomendação de intervenção cirúrgica.

De acordo com CIANCO¹⁴, 1997, as doenças periodontais são resultantes de infecções bacterianas, e assim, o autor acredita que antimicrobianos e outros quimioterápicos podem apresentar-se como

poderosos auxiliares em complemento à terapia mecânica na tentativa de limitar a progressão das doenças dos tecidos gengivais. Temos para o controle da placa supragengival uma ferramenta de grande poder representada pelo bochecho de colutórios antimicrobianos de ação tópica, que apresentam uma boa eficácia no controle desta. Os diversos trabalhos conduzidos neste sentido levam a crer que o efeito destes medicamentos pode ser melhor aproveitado quando se utilizam dispositivos para irrigação. Posto isto, observa-se que os antibióticos apresentam-se notadamente eficazes no tratamento da periodontite juvenil, periodontite de avanço rápido e da refratária. Assim, o autor conclui sugerindo que o uso de tetraciclina para promover a cicatrização, pela estabilização do colágeno, e o uso de drogas antiinflamatórias não esteróides e inibidores de prostaglandinas constitui uma promessa para o controle da doença periodontal.

Em 1997, NOYAN et al.⁸², realizaram um trabalho onde foi estudado o efeito do uso de metronidazol local (Elyzol) e sistêmico (Flagyl), quando utilizados no tratamento da periodontite adulta, observando-se o uso do metronidazol somente ou em combinação com o debridamento mecânico. A avaliação foi realizada considerando-se parâmetros clínicos e microbiológicos em indivíduos distribuídos aleatoriamente em grupos de tratamento local e sistêmico. Cada um destes grupos continha 5 participantes, os quais apresentavam 4 sítios, sendo ao menos 1 sítio por quadrante com profundidade de sondagem ≥ 5 mm, recebendo os diversos tratamentos propostos. O delineamento do experimento determinou 6 diferentes grupos teste: (1) raspagem e aplainamento radicular; (2) tratamento com metronidazol tópico; (3) tratamento com metronidazol sistêmico; (4) metronidazol tópico combinado com raspagem e aplainamento radicular; (5) metronidazol sistêmico combinado com raspagem e aplainamento radicular; (6) nenhum tratamento. Após um monitoramento de 42 dias dos tratamentos realizados, onde foram observados os índices clínicos e microbiológicos, os resultados demonstraram efeitos positivos para os aspectos clínicos (gengivite, profundidade de sondagem, nível de inserção) em todos os grupos, exceto no grupo que não recebeu tratamento algum; assim como houve uma redução em relação ao número total de bactérias e às bactérias anaeróbias estritas. Os dados obtidos

demonstraram que os tratamentos combinados procediam a melhores resultados frente à infecção quando comparados aos tratamentos mecânico somente ou metronidazol isoladamente, no entanto, os autores concluem sugerindo que o metronidazol tópico em combinação com a raspagem e aplainamento radicular parece ser mais eficiente para os parâmetros estudados.

De acordo com KILLOY⁴⁶, 1998, a periodontite é uma infecção bacteriana que pode manifestar-se de forma generalizada, mas que muito freqüentemente pode estar presente em áreas localizadas da cavidade bucal do paciente, ou então ser minimizada a pequenos sítios, devido à intervenção mecânica do cirurgião-dentista. Sugere ainda que a aplicação local de medicamento antimicrobiano, pode também constituir uma excelente opção para o tratamento da periodontite. Assim, vários sistemas têm sido utilizados com objetivo de liberar localmente altas concentrações, de forma segura, de um antimicrobiano diretamente no sítio da infecção periodontal. Uma grande vantagem de se utilizar esta via de aplicação é permitir que se alcancem concentrações consideravelmente altas da medicação do que se poderia obter com a administração sistêmica, enquanto que a absorção sistêmica do medicamento é mínima. O autor informa que os sistemas de aplicação local disponíveis (fibras de tetraciclina, polímero de doxiciclina, chip de clorexidina, pomada de minociclina e gel de metronidazol), representam um recurso adicional ao clínico para o tratamento das doenças periodontais inflamatórias crônicas de grande valia. Conclui, no entanto, que as técnicas de uso, suas indicações e evidências científicas que sustentam sua indicação devem ser melhor discutidas.

MAGNUSSON⁶⁴, 1998, considera a periodontite resultante de infecções que são causadas por patógenos específicos e, assim, acredita ser a utilização local de microbianos, uma alternativa para controlar o processo infeccioso e debelar a doença periodontal. O autor ressalta que vários medicamentos são estudados para atuarem como coadjuvantes na terapia periodontal mecânica (raspagem e aplainamento radicular) ou mesmo utilizados como quimioterápicos isolados. Relata ainda que, estes agentes,

quando utilizados como soluções de irrigação em dose única, não têm apresentado um bom desempenho em tratamentos periodontais de longa duração. Conclui sugerindo que, de acordo com estudos mais recentes, para se obter concentrações mais eficientes da droga no interior da bolsa periodontal por maiores períodos, a administração de fórmulas de liberação lenta deve ser preferida.

Para comparar o efeito clínico e sobre as bactérias periodontais de duas modalidades terapêuticas, aplicação local de um antimicrobiano e raspagem subgengival e alisamento radicular, RUDHART et al.⁹⁶, 1998, realizaram um estudo aleatório semi-mascarado. 46 pacientes em controle, após terem completado tratamento periodontal entre 6 e 24 meses, com ao menos 1 sítio de profundidade de sondagem de 5,0 mm em cada quadrante, e que não receberam raspagem dentária ou tratamento com quimioterápicos nos últimos 6 meses, foram selecionados para participar deste estudo. Aleatoriamente todos os pacientes receberam dois tipos diferentes de tratamento. O primeiro orientava a aplicação subgengival, nas bolsas, de metronidazol 25% em gel em dois quadrantes nos dias 0 e 7; o segundo realizava apenas a raspagem e alisamento radicular nos outros 2 quadrantes, também nos dias 0 e 7. De cada participante foram obtidas amostras subgengivais de microrganismos antes do tratamento e nos dias 21, 91 e 175, as quais foram analisadas por imunofluorescência indireta. Também foi anotada a profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento à sondagem (SS), para todos os sítios tratados, em 0, 21, 91 e 175 dias. Após a análise dos resultados observou-se que ambos os tratamentos proporcionavam redução da PS e ganho de NIC, apresentando-se a redução de PS estatisticamente significativa ($p < 0,01$) nos dois tipos de tratamento após 6 meses, no entanto, o ganho de NIC não alcançou significância em nenhuma modalidade de tratamento. Também não foi observada diferença estatística entre a raspagem e a antibioticoterapia. Em relação às observações para a avaliação microbiológica, houveram reduções significantes nos níveis de *T. denticola*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* após os tratamentos sem, no entanto, apresentar diferença estatisticamente significativa entre eles. Para o *A. actinomycetemcomitans* não houve alteração em seu

perfil. Com os dados obtidos os autores concluíram que, para o paciente em controle, os tratamentos propostos, a aplicação local de metronidazol e raspagem com aplainamento radicular, mostraram efeitos clínicos e microbiológicos similares sem diferenças estatísticas significantes.

Partindo do pressuposto que o controle de placa subgingival é de suprema importância no tratamento das doenças periodontais, e que o papel da antibioticoterapia subgingival de liberação lenta necessita de maiores esclarecimentos, com o objetivo de comparar os efeitos da aplicação subgingival de uma formulação odontológica de um gel de metronidazol 25% com a curetagem subgingival, AWARTANI; ZULQARNAIN⁷, 1998, realizaram um estudo cego com 13 pacientes que apresentavam periodontite adulta. O trabalho foi delineado de forma a distribuir os tratamentos em hemiarcos, de maneira que todos os pacientes receberiam todos os tratamentos simultaneamente. Os quadrantes foram selecionados aleatoriamente quanto ao tratamento com a aplicação de metronidazol gel, curetagem subgingival, ou uma combinação de curetagem e aplicação de gel. Os quadrantes remanescentes em cada paciente foram deixados sem tratamento, como controle. Os resultados obtidos evidenciaram que os três tratamentos reduziram significativamente o índice de placa, índice gengival, e o sangramento à sondagem por um período de 14 semanas, onde foi feito seu acompanhamento. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre somente curetagem e curetagem mais metronidazol. A curetagem e curetagem mais metronidazol apresentaram-se mais efetivas que somente o metronidazol. O metronidazol produziu efeitos transitórios, melhor observados durante as primeiras 4 semanas após o tratamento, no entanto, não foi observado efeito adicional do metronidazol quando do tratamento combinado. Por fim, na última observação, durante a décima-quarta semana, apenas os sítios onde foram realizados o tratamento combinado (curetagem mais metronidazol) e a curetagem somente, apresentavam reduções estatisticamente significativas na profundidade de sondagem quando comparados aos sítios controles. Em posse destes resultados os autores concluíram que a curetagem subgingival somente, pode ser tão eficaz para o

tratamento da periodontite adulta, suave à moderada, quanto à curetagem associada a antibióticos.

Com a finalidade de comparar as respostas clínicas e microbiológicas subseqüentes ao tratamento da periodontite adulta, moderada a avançada, sem intervenção cirúrgica, somente raspagem em duas situações, utilizando adicionalmente metronidazol tópico e metronidazol sistêmico, PALMER; MATTHEWS; WILSON⁸⁵, 1998, realizaram um estudo cego em 90 indivíduos, aleatoriamente, classificados de acordo com a doença periodontal e hábito de fumar e divididos em 3 grupos de tratamento: 1. Raspagem subgingival usando-se curetas ultra-sônicas e anestesia local; 2. Raspagem subgingival usando-se curetas ultra-sônicas e anestesia local mais metronidazol sistêmico por 7 dias (200mg, 3x ao dia); 3. Raspagem subgingival usando-se curetas ultra-sônicas e anestesia local mais 2 aplicações de gel de metronidazol 25% ao longo de uma semana em todos os sítios com profundidade de sondagem maior do que 4 mm. Foram realizadas leituras previamente à terapia, com 8 e 24 semanas após esta, avaliando profundidade de sondagem, níveis de inserção e sangramento à sondagem, este último com o auxílio de uma “sonda Flórida”. Para a avaliação das bactérias presentes utilizou-se um microscópio de campo escuro para identificação morfológica destas. Para análise dos resultados foram selecionados os sítios com profundidade de sondagem $\geq 4,6$ mm, demarcados pela sonda. A metodologia estatística utilizada foi a análise de variância. Ao final do estudo 84 pacientes foram avaliados para os parâmetros clínicos escolhidos, lembrando que no início das avaliações os 3 grupos de tratamento não se apresentavam diferentes entre si. A profundidade média de sondagem apresentou-se reduzida em mais de 1,6 mm para todos os grupos estudados (grupo 1 = 1,68 mm, grupo 2 = 1,62 mm, grupo 3 = 1,74 mm) após 6 meses de tratamento sem, no entanto, apresentar-se estatisticamente significativa entre eles. Os demais índices não apresentaram diferença estatisticamente significativa quer seja para o nível de inserção, sangramento à sondagem, índice de placa ou alteração na proporção de tipos morfológicos bacterianos. Após a análise dos resultados obtidos, embora tenha havido redução na profundidade de sondagem, esta não foi suficiente para que os autores

recomendassem o uso de metronidazol adicional no tratamento periodontal não cirúrgico.

O *A. actinomycetemcomitans* pode ser transmitido entre membros de uma mesma família. O objetivo deste estudo de KLEINFELDER; MULLER; LANGE⁴⁹, 1999, foi avaliar se esta bactéria é capaz de persistir por um longo período de tempo em indivíduos periodontalmente saudáveis após a eliminação deste patógeno nos membros doentes da família. Em 14 pacientes com periodontite que abrigavam o patógeno, assim como em seus 37 membros da família, o estado clínico (profundidade de sondagem de bolsa – PPD, nível de inserção – PAL, índice de placa – PI e índice gengival – GI) e microbiológico (TSBV) foi avaliado. Após o estudo, os pacientes receberam tratamento mecânico, cirúrgico e antibiótico (3 vezes 375 mg de amoxicilina + 3 vezes 250 mg de metronidazol por 7 dias), e, assim como seus parentes, foram reavaliados 3, 6, 9 e 12 meses após a terapia. De 13 cônjuges, 4 (31%) tinham periodontite associada com *A. actinomycetemcomitans*, e 4 (31%) apresentavam periodontite sem esta associação; 2 (15%) estavam periodontalmente saudáveis e abrigavam o microrganismo, e 3 (23%) estavam saudáveis e sem detecção da bactéria. De 24 descendentes, 1 (4%) apresentava periodontite associada ao *A. actinomycetemcomitans*, 8 (33%) estavam saudáveis e abrigavam a bactéria, 15 (63%) estavam saudáveis sem a detecção da mesma. Em 2 cônjuges e 7 dos 8 descendentes que estavam saudáveis, porém abrigavam o *A. actinomycetemcomitans*, este patógeno persistiu pelos 12 meses de acompanhamento, após ter sido eliminado dos membros doentes das famílias. Somente uma criança tornou-se negativa para o periodontopatógeno após 12 meses. Os resultados obtidos por este estudo indicaram que o *A. actinomycetemcomitans* é capaz de persistir na cavidade oral de indivíduos periodontalmente saudáveis por ao menos 12 meses após este ter sido eliminado de familiares doentes. Isto que sugere que mesmo em membros saudáveis, o microrganismo como fonte de transmissão, deve ser eliminado para prevenir a re-infecção.

Com o objetivo de comparar se a aplicação do gel odontológico de metronidazol 25% (Elyzol Dental Gel) tem a mesma eficácia da raspagem e

alisamento radicular, KNOLL-KOHLER⁵¹, 1999, realizou uma investigação através de 80 avaliações clínicas experimentais, utilizando o gel dental durante 2 semanas em um hemiarco e raspagem e aplainamento radicular em outro, para o tratamento da periodontite adulta. Os resultados obtidos após a avaliação foram pontuados seguindo os critérios estabelecidos por ANTCZAK et al.⁴, 1986, e BEGG et al.⁸, 1996, apud KNOLL-KOHLER⁵¹, 1999. Podendo atingir um valor máximo de 1,0 para cada situação, a pontuação determinada foi de $0,107 \pm 0,033$ ($\bar{x} \pm dp$), intervalo de 0,072 a 0,168, no reporte do protocolo de estudo, e de $0,285 \pm 0,084$, intervalo de 0,120 a 0,400, para a análise de dados, apresentação e discussão. De acordo com o autor, ainda que os resultados do estudo demonstrem haver igualdade de valores para os dois tratamentos, a qualidade das avaliações experimentais não permite uma adequada avaliação comparativa da terapia. E assim, conclui que os dados levantados não são suficientes para suportar a indicação do gel odontológico de metronidazol de ação local como uma alternativa a instrumentação mecânica em periodontite adulta.

Para comparar se o uso de um gel de metronidazol 1% teria o mesmo efeito clínico e microbiológico da formulação a 25%, PICCOLOMINI et al.⁹¹, 1999, realizaram aplicações diárias, intra-sulco, deste medicamento durante uma semana em 9 pacientes portadores de periodontite adulta. Normalmente utilizado em dermatologia, o quimioterápico, na concentração utilizada, foi capaz de reduzir a profundidade de sondagem da bolsa, sangramento gengival e índice de placa, assim como os valores bacteriológicos do *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *V. parvula*, estes associados à doença periodontal adulta. Esta redução apresentou-se estatisticamente significativa e os resultados observados, de acordo com a conclusão dos autores, são similares àqueles obtidos com o gel de metronidazol 25% administrado 2 vezes num período de 7 dias.

POULET; DUFFAT; LODTER⁹³, 1999, realizaram um estudo com o objetivo de determinar a susceptibilidade da *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *Fusobacterium ssp* e *P. micros* ao metronidazol *in vitro*. Para realização deste trabalho foram aplicados dois métodos para cada cepa bacteriana estudada, a

diluição em agar e por meio do Epsilometer Etest, este último considerado um método simples, rápido e confiável para o teste de susceptibilidade ao metronidazol. Amostras de cepas teste, em estado natural, foram isoladas de pacientes com periodontite, sendo um total de 53: 13 *P. intermedia*, 14 *P. gingivalis*, 14 *Fusobacterium ssp* e 12 *P. micros*. Os dados resultantes demonstraram que todas as cepas de *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *Fusobacterium ssp* apresentaram-se susceptíveis ao metronidazol, e a concentração mínima para a inibição, quando utilizado o método da diluição em agar, foi 0,98 µg/mL, 0,122 µg/mL e 0,242 µg/mL, respectivamente. Para o *P. micros*, a mínima concentração inibitória foi de 12,14 µg/mL. Para os autores, em relação ao ponto de quebra, apenas 60% das cepas de *P. micros* parecem ser susceptíveis ao metronidazol neste estudo *in vitro*, e concluem relatando que o quimioterápico apresentou uma excelente atividade contra a *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *Fusobacterium ssp*, porém não foi tão eficaz quando utilizado com a *P. micros*.

O trabalho realizado por RIEP; PURUCKER; BERNIMOULIN⁹⁴, 1999, buscou avaliar o comportamento do metronidazol, utilizado este quimioterápico como um suplemento à raspagem e aplainamento radicular (RAR), comparando-o com a RAR simplesmente. Com um delineamento simples-cego, 30 indivíduos foram incluídos neste estudo de acordo com os critérios de seleção a seguir: pacientes em tratamento que possuíssem 2 sítios não contíguos de profundidade de sondagem $\geq 6,0$ mm, com sangramento à sondagem em quadrantes diferentes, que sofreram qualquer tipo de tratamento periodontal nos últimos 3 meses, e sem contato com antimicrobianos há pelo menos 6 meses. Estes participantes foram distribuídos de forma aleatória em grupos seguindo a orientação de RAR e aplicações subgingivais, por 5 vezes durante 10 dias, de metronidazol 25% em gel (Elyzol) para o grupo teste e, RAR sem qualquer terapia adicional para o grupo controle. A avaliação microbiológica foi feita por meio de amostras subgingivais que foram retiradas antes do tratamento iniciar e após 21 dias e 3 meses do tratamento concluído. Estas foram analisadas utilizando um teste clínico comercial (Evalusite) com reações específicas para *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans*, também foi pesquisada a profundidade de sondagem

das bolsas (PS), nível de inserção (NI) e sangramento à sondagem (SS), registrados inicialmente e decorridos 3 meses. Analisando os resultados os autores verificaram que houve redução estatisticamente significativa na PS ($p < 0,001$) nos dois grupos estudados, o mesmo comportamento foi observado para o aumento de NI e diminuição de SS, não apresentando, no entanto, diferença significativa entre os diferentes tratamentos. Em relação às bactérias estudadas, a *P. gingivalis* apresentou-se estatisticamente reduzida nos dois grupos, sem diferenças entre eles; a *P. intermedia* apresentou-se significativamente reduzida somente após a RAR, e para o *A. actinomycetemcomitans* esta redução não foi observada em ambos os tratamentos. Frente a estes dados foi possível concluir que a aplicação tópica repetida de metronidazol em adição a RAR e a RAR simplesmente comportou-se de forma semelhante para o tratamento da doença periodontal e, em relação aos parâmetros microbiológicos avaliados, também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto para a *P. intermedia*.

O efeito da aplicação tópica de metronidazol gel (Elyzol Dental Gel) e uma terapia conjunta no tratamento da periodontite adulta foram avaliados clinicamente por AL-MUBARAK; KARRING; HO³, 2000. Um único examinador cego realizou os exames clínicos. 14 pacientes participaram do estudo, onde cada um recebeu 4 tipos diferentes de tratamento incluindo o controle, e os quatro tratamentos foram aplicados aleatoriamente ao menos em um dente de cada quadrante, em cada paciente, em um delineamento comparativo entre os quadrantes bucais. Os exames foram efetuados antes do tratamento e 90 dias após. Todos os pacientes tinham ao menos um dente em cada quadrante com profundidade e sondagem ≥ 5 mm. Os 4 grupo de tratamento foram: (I) uma sessão de uma hora de raspagem e alisamento radicular, (II) metronidazol 25% em gel (Elyzol Dental Gel) aplicado no dia 0 e dia 7, (III) raspagem mais aplicação de metronidazol 25%, e (IV) nenhum tratamento. Instrução de higiene oral foi oferecida a todos os pacientes ao início do estudo. Ao final (dia 90), todos os grupos tinham melhora estatisticamente significativa na profundidade de sondagem ($p < 0,02$), e nos índices de placa e sangramento ($p < 0,05$) comparados ao dia 0. Entretanto, o grupo III apresentou a maior melhora estatisticamente significativa ($p < 0,03$) na profundidade de sondagem do que

os outros grupos. Ambos os grupos, I e II, apresentavam melhores índices de profundidade de sondagem, significativamente ($p < 0,05$), comparados ao grupo controle. Por outro lado, os dois grupos não apresentavam diferença significativa entre si. Devido aos resultados, os autores sugeriram que o tratamento tópico com Elyzol pode melhorar a saúde periodontal tanto quanto a raspagem e alisamento radicular, e que um tratamento em conjunto poderia resultar em um efeito terapêutico adicional.

Para KINANE⁴⁸, 2000, a terapia periodontal tem como objetivo principal interromper a progressão da doença periodontal. As pesquisas clínicas ao longo dos anos têm demonstrado que a raspagem meticulosa e alisamento radicular, em conjunto com um apropriado controle de placa pelo paciente, podem deter a periodontite, mas esta terapia não é sempre completamente efetiva e, assim, uma terapia auxiliar deve ser considerada. A liberação local de agentes antimicrobianos nas bolsas periodontais tem sido extensamente desenvolvida e investigada desde o final dos anos 70, e muitos sistemas tem sido desenhados para manter níveis altos de agentes antibióticos no fluido do sulco com uma ingestão sistêmica mínima. Mais recentemente, um sistema de liberação subgingival de antimicrobianos tornou-se disponível ao periodontista para o uso clínico. Estes sistemas empregam um agente antimicrobiano diferente, mas também, diferentes sistemas de liberação, os quais influenciam a concentração disponível da droga ao longo do tempo. O clínico pode confundir-se com a ampla variedade de antimicrobianos subgingivais de liberação lenta disponíveis no mercado, assim, uma avaliação clara e independente destas terapias faz-se necessária. Em sua revisão, o autor resume os achados de um estudo comparativo de 3 sistemas de liberação local, usualmente disponíveis, para sítios periodontais previamente tratados mecanicamente sem sucesso. As estratégias de liberação lenta estudadas em conjunto com o alisamento radicular foram: Actisite, Dentomycin e Elyzol; comparadas ao alisamento radicular isoladamente. A substantividade de um sistema antimicrobiano é a habilidade deste em manter uma concentração efetiva da droga por um tempo, no qual se pode obter o melhor resultado significativo entre os 3 sistemas testados sem levar em consideração a o medicamento utilizado. Assim, embora todos os 3 sistemas de aplicação

utilizados tenham oferecido benefícios comparados à raspagem e alisamento unicamente, o regime de tratamento de raspagem e alisamento + a colocação da fibra de tetraciclina apresentou a melhor redução na profundidade de sondagem após 6 meses de tratamento.

O objetivo do estudo de JANSSON et al.⁴², 2004, foi avaliar o efeito microbiano, em pacientes com periodontite recorrente, do uso de metronidazol, utilizado a reação em cadeia da polimerase (PCR). 20 indivíduos de um programa de acompanhamento, mas com periodontite recorrente, participaram deste. 3 meses após a raspagem e alisamento radicular, um total de 40 sítios, 2 em cada paciente, com profundidade de bolsa ≥ 5 mm foram selecionados. Um sítio aleatoriamente selecionado foi tratado com metronidazol gel 25% (teste) e o outro com um gel placebo (controle). Uma amostra bacteriana foi coletada com pontal de papel de cada sítio teste ou controle ao início e após 12 semanas do tratamento. Os seguintes patógenos foram analisados e detectados por PCR: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. No início, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens* foram detectados em 30, 60 e 70% dos sítios testes e em 32, 58 e 21% dos sítios controles. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os sítios teste e controle para *P. nigrescens* no início. A maior diferença após o tratamento com metronidazol gel 25% era o aumento dos sítios controle, positivos para *P. gingivalis* e *P. nigrescens*. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na taxa de ocorrência de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. nigrescens* nos sítios teste e controle após o tratamento. Assim, este estudo demonstrou que o metronidazol gel 25% não parece influenciar as bactérias, utilizando-se PCR para analisar a presença/falta de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. nigrescens*, neste grupo de indivíduos com doença periodontal recorrente.

Estudando 52 pacientes, entre 22 e 68 anos, com periodontite crônica generalizada em diferentes graus de severidade e 223 com periodontite severa fulminante, GRUDIANOV; DMITRIEVA; OVCHINNIKOVA³⁴, 2002, observaram o efeito do Metrogil-denta em várias formulações de metronidazol. Os resultados que encontraram para o efeito bacteriostático e bactericida deste

medicamento, dependiam da gravidade periodontal envolvida e da concentração da droga. O máximo efeito bacteriostático observado estava entre 20-25% e o máximo efeito bactericida em 25% da concentração do metronidazol, sem levar em consideração a severidade da periodontite.

O propósito para esta revisão de WALKER; KARPINIA¹²⁷, 2002, foi prover o clínico com algumas razões práticas para a seleção e uso de antibióticos no tratamento da doença periodontal destrutiva. Os autores tiveram a intenção de integrar aproximadamente 20 anos de literatura descrevendo a antibioticoterapia com os conceitos do século 21. Este artigo focou o uso do antibiótico durante o tratamento da periodontite agressiva com ênfase na doença juvenil e doença refratária adulta. A literatura revelou poucos estudos detalhados e com controle, que comparassem a eficácia do uso em conjunto de antimicrobianos com a terapia mecânica. Ainda menos estudos avaliaram a efeito de um antibiótico comparado a outro. Entretanto, baseados nas evidências disponíveis, certas conclusões foram desenhadas. O uso auxiliar de antibióticos acompanhando o debridamento mecânico é recomendado para o tratamento de periodontite associada ao *A. actinomycetemcomitans*, e aceito como um regime terapêutico. Devido a emergente resistência à tetraciclina desenvolvida pelo *A. actinomycetemcomitans*, a combinação de metronidazol e amoxicilina pode ser preferida. Na periodontite refratária agressiva, uma persuasiva evidência existe de que, o uso de um antibiótico auxiliar apropriado fornece uma resposta clínica mais favorável do que a terapia mecânica isoladamente. Infelizmente, a seleção do antibiótico não é clara e é, provavelmente, caso-dependente. Respostas positivas têm sido relatadas com amoxicilina/ácido clavulânico, clindamicina, metronidazol, e com a terapia combinada de metronidazol mais amoxicilina. Por fim, a introdução de antibióticos de liberação local, específicos para o tratamento da periodontite, oferece um novo conceito para o tratamento da doença localizada. Estes, em particular, podem tornar-se úteis no tratamento da doença de recorrente atividade ou somente nos sítios envolvidos.

De acordo com a informação de prescrição do Elyzol 25% Dental Gel (COLGATE-PALMOLIVE¹⁵, 2005), sua fórmula ativa de benzoato de

metronidazol, desenhada para aplicação diretamente nas bolsas periodontais, devido à grande fluidez preenche toda a bolsa. Ao contato com o fluido gengival forma um gel altamente viscoso que libera o metronidazol lentamente. O metronidazol tem efeito bactericida contra microrganismos anaeróbicos, porém, não afeta bactérias aeróbicas. Algumas bactérias anaeróbicas facultativas, como o *A. actinomycetemcomitans*, também são sensíveis às concentrações de metronidazol alcançadas após a aplicação do Elyzol 25% Dental Gel, geralmente acima de 100 µg/mL por ao menos 8 horas e acima de 1 µg/mL encontrada após 36 horas. O metronidazol é vagarosamente absorvido a partir do gel e sua biodisponibilidade é cerca de 70%. A concentração no plasma alcança seu máximo após cerca de 4 horas. Concentrações sistêmicas acima de 1,3 µg/mL não foram encontradas. Seu uso indicado em casos de periodontite, tem como contra-indicação a hipersensibilidade ao metronidazol. Devido às baixas concentrações plasmáticas após a aplicação local, o risco de efeitos colaterais sistêmicos é baixo, não apresentando risco de superdosagem sistêmica. Os riscos mais comuns são mínimos, a saber, a ocorrência de gosto amargo e ardência local temporária. A eliminação é através da urina, com cerca de 15-20% dos metabólitos do metronidazol sob forma inalterada. O Elyzol 25% Dental Gel é administrado na bolsa periodontal duas vezes com intervalo de uma semana. A dose é individual, dependente do número de dentes a serem tratados. A dose é administrada por meio de uma seringa dental fornecida, com agulha flexível e sem corte. O tratamento não deve ser repetido, a princípio, antes de 6 meses do início da terapia. Durante o tratamento o paciente poderá alimentar-se sem qualquer restrição e a correta higiene bucal deverá ser observada, no entanto, fio dental, escovas interdentais e palitos de dente não deverão ser utilizados no dia seguinte à aplicação.

O estudo de GRUDIANOV; OVCHINNIKOVA; DMITRIEVA³⁵, 2006, foi realizado com Metrogil-denta (MD), com a concentração de 0,25% de clorexidina estável e metronidazol 1% para prevenção e 25% para tratamento da doença periodontal inflamatória. Os resultados do uso em 76 pacientes foram demonstrados, com a concentração de 1% falhando em eliminar a microflora aeróbica e anaeróbica. Os autores encontraram os melhores

resultados, considerando o efeito bactericida, no Metrogil-denta com a concentração de 25% de metronidazol.

2.5 Real-Time PCR

A. actinomycetemcomitans e *P. gingivalis* são fortemente associados com periodontite. Entretanto, pouco é conhecido sobre sua distribuição em indivíduos saudáveis, visto que as técnicas de cultura não são sensíveis o suficiente. Em seu estudo, TRAN; RUDNEY¹²³, 1996, utilizaram uma modificação da multiplex PCR para resolver esta questão. O método utilizava dois primers espécie-específicos forward em combinação com um único primer reverse. Estes primers marcavam regiões variáveis e preservadas do gene 16S rRNA. A sensibilidade foi determinada pela diluição seriada de células de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*. Um primer específico foi testado para (I) seis cepas de *A. actinomycetemcomitans* e quatro cepas de *P. gingivalis*, (II) sete espécies diferentes de bactérias orais, e (III) placa supra e subgingival de 20 indivíduos. A multiplex PCR tinha como limite inferior a detecção de 2 células de *A. actinomycetemcomitans* e 30 de *P. gingivalis*. Amplicons espécie-específicos foram obtidos para todas as cepas das bactérias testadas, e o mesmo não ocorreu com as outras 7 bactérias testadas. Nenhuma espécie alvo foi detectada na placa supragingival; *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em uma amostra subgingival, e *P. gingivalis* foi detectada em outra. Quando as amostras de placa foram semeadas com 10 células de *A. actinomycetemcomitans* e 100 células de *P. gingivalis*, amplicons espécie-específicos foram detectados. Devidos aos seus resultados, os autores concluíram que esta multiplex PCR poderia ser altamente sensível e específica enquanto permitira a detecção dos dois patógenos estudados, e que este exame teria potenciais aplicações em estudos epidemiológicos, diagnósticos, planos de tratamento e monitoração de periodontopatógenos.

A acurada quantificação das espécies bacterianas na placa dentária é necessária no diagnóstico microbiológico das doenças periodontais. O estudo de MAEDA et al.⁶³, 2003, foi delineado para avaliar a sensibilidade, especificidade e capacidade de quantificação da Real-Time PCR usando o

sistema “GeneAmp Sequence Detection” com dois componentes químicos fluorescentes. Sondas TaqMan com corante marcador e silenciador e corante SYBR Green foram utilizados como fonte de fluorescência. Primers e sondas foram desenhadas para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e bactérias totais baseados nas seqüências 16S rRNA ribossômica dos respectivos genes. Uma vez que o aumento da resistência dos genes a antibióticos é um problema crucial na terapia periodontal, a detecção quantitativa do gene tetQ, o qual confere resistência à tetraciclina, foi incluída no trabalho. A detecção de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* foi linear em uma escala de 10^{-10} - 10^{-7} células (10^{-10} - 10^{-7} cópias para o gene tetQ), enquanto que a escala quantitativa para bactérias totais foi 10^{-2} - 10^{-7} células. Amplificações espécie-específica foram observadas para as três bactérias e, não havia diferença significativa entre a TaqMan e o SYBR Green em sua especificidade, sensibilidade e capacidade de quantificar. Os ensaios com SYBR Green, mais simples do que com TaqMan em sua manipulação, foram aplicados às mostras clínicas. As amostras de placa foram obtidas de 8 pacientes (8 bolsas periodontais) antes e uma semana da aplicação local de minociclina. Embora o número de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* tenham diminuído sensivelmente após a terapia antibiótica, na maioria dos casos, um maior número de cópias do gene tetQ foi detectado. Assim, concluíram que a Real-Time PCR demonstrou sensibilidade, especificidade e capacidade de quantificar suficientes, constituindo uma poderosa ferramenta para exame microbiológico na doença periodontal e, o acompanhamento quantitativo da resistência do gene aos antibióticos em conjunto com a terapia antibiótica deve ser incluído nos exames.

A análise quantitativa, com a identificação de bactérias periodontopatogênicas, é importante para o diagnóstico, acompanhamento terapêutico e avaliação do risco à doença periodontal. KUBONIWA et al.⁵³, 2004, desenvolveram um método extremamente sensível e específico utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR) para detectar e quantificar seis bactérias periodontais: *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Jogos espécie-específicos de sondas/primers TaqMan foram

desenhados de acordo com a seqüência genética 16S rRNA ribossômico. Resíduos de placa e da língua foram coletados de 10 pacientes com periodontite avançada e 10 pacientes com periodonto saudável e posteriormente analisados. Todas as espécies, menos *P. nigrescens*, foram detectadas nas amostras dos sítios doentes em número significativamente maior do que nas amostras coletadas em sítios saudáveis, enquanto que os maiores números de *P. nigrescens* foram encontrados nos controles. Face aos resultados, sugeriram que o método da Real-Time PCR com “kits” desenhados de sonda/primer permitia uma detecção sensível das 6 bactérias periodontais, e poderia também, futuramente, contribuir para estudos microbiológicos da doença periodontal.

Acredita-se que bactérias específicas desempenham um papel importante na periodontite crônica, ainda que o significado de seus números no início e progresso da doença ainda permaneça impreciso. NONNENMACHER et al.⁸⁰, 2004, reportaram o desenvolvimento de uma sensível e quantitativa técnica de PCR para contar *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Dialister pneumosintes* e *Micromonas micros*, assim como o número total de eubactérias na placa subgengival de indivíduos com periodontite. A quantificação foi realizada com seqüências alvo-específicas 16S rRNA mais sondas marcadas com dupla fluorescência e diluições seriadas de plasmídeos padrão através de Real-Time PCR. Este método demonstrou uma larga quantificação variando entre $10^{(2)}$ a $10^{(8)}$ e acurada sensibilidade e especificidade. 50 amostras de placa de pacientes com periodontite e 33 de indivíduos saudáveis periodontalmente foram avaliadas. Os maiores níveis de bactérias totais, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Dialister pneumosintes* e *Micromonas micros* foram detectados em amostras de participantes com periodontite comparados aos saudáveis. Dessa forma, concluíram que a Real-Time PCR quantitativa fornece um método confiável e valioso para a quantificação de periodontopatógenos em amostras de placa subgengival.

O trabalho de PEREA⁹⁰, 2004, descreve o aspecto fundamental dos métodos moleculares que estão sendo aplicados à microbiologia oral: sondas,

PCR, PCR múltiplo em tempo real, 16S rRNA e análise proteômica. Do mesmo modo, apresenta os resultados obtidos pela aplicação destes métodos para estudar a flora bacteriana encontrada dentro da boca. Através da identificação por 16S rRNA, acima de 132 espécies conhecidas e 215 novos, desconhecidos filotipos tem sido detectados no interior de bolsas de pacientes periodontais. Atualmente está sendo usado um sistema comercial baseado em uma múltipla PCR (amplificação genômica), seguida pela hibridização reversa para detectar 5 espécies conhecidas causadoras da doença periodontal. Também foram resumidos os achados derivados da aplicação de técnicas proteômicas para estudar a patogênese das infecções odontológicas e, a partir do uso de técnicas moleculares no estudo da resistência antimicrobianas a agentes terapêuticos. Por fim, colocaram-se à frente de problemas que permaneciam não resolvidos em relação à flora oral e ao tratamento de infecções odontogênicas. Os métodos tradicionais de cultura continuam a ser indispensáveis, uma vez que tornam possível trabalhar com os microorganismos cultivados posteriormente.

Para BOUTAGA et al.¹¹, 2005, a periodontite é uma doença inflamatória, crônica e multifatorial que acomete os tecidos de suporte dos dentes. Técnicas quantitativas de cultura anaeróbicas têm sido utilizadas para o diagnóstico microbiano nas diferentes formas da doença. O objetivo deste estudo foi comparar a Real-Time PCR com cultura anaeróbia quantitativa para detecção e quantificação de 5 periodontopatógenos conhecidos. Os exames de Real-Time PCR com genes 16S rRNA de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *P. micros* e *Fusobacterium ssp.* Foram realizados. A PCR foi validada por cultura de cepas puras de várias bactérias. Subsequentemente, amostras de placa subgengival de 259 pacientes adultos com periodontite foram analisadas por meio de cultura anaeróbica quantitativa e Real-Time PCR. Uma curva-padrão para a quantificação de DNA foi criada para cada jogo de primer-sonda, baseada nas unidades formadoras de colônias equivalentes (UFC). Todas as espécies de bactérias foram corretamente identificadas. O menor limite de identificação pela PCR variou de 1-50 UFC dependendo da espécie. Nenhuma reação-cruzada com DNA semelhante de outras espécies foi observada. Os resultados da Real-Time

PCR demonstraram um alto grau de concordância com os resultados da cultura anaeróbica, o que permitiu concluir que a Real-Time PCR é uma alternativa confiável para o diagnóstico quantitativo de culturas anaeróbicas de amostras de placa subgengival.

A cultura bacteriana é um método bem estabelecido para analisar amostras de placa. A Real-Time PCR é um recente e rápido método para a identificação e quantificação de bactérias periodontopatogênicas que tem sido ultimamente inserido nas pesquisas. O objetivo de JERVOE-STORM et al.⁴³, 2005, em seu estudo foi comparar a Real-Time PCR com cultura convencional de anaeróbios. Um total de 78 amostras subgengivais de placa foram coletadas de bolsas ≥ 5 mm em 22 pacientes com periodontite crônica avançada e imediatamente transferidos para um meio de transporte. Alíquotas foram avaliadas pela Real-Time PCR com sondas espécie-específicas (meridol Perio Diagnostics, GABA) e cultura de bactérias anaeróbicas em meio seletivo para detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. forsythensis*. As análises foram realizadas por dois examinadores cegos separadamente. Quando a Real-Time PCR foi comparada com o método de cultura (padrão ouro) para detecção de periodontopatógenos, a sensibilidade e especificidade para *A. actinomycetemcomitans* foi 67% e 100%, respectivamente (kappa: 0,79); para *F. nucleatum* 73% e 53%, respectivamente (kappa: 0,21); para *P. gingivalis* 94% e 84%, respectivamente (kappa:0,77); para *P. intermedia* 33% e 94%, respectivamente (kappa: 0,26); e para *T. forsythensis* 92% e 56%, respectivamente (kappa: 0,51). O coeficiente de correlação de Spearman para os resultados quantitativos de ambos os métodos foram 0,82 para *A. actinomycetemcomitans*, 0,33 para *F. nucleatum*, 0,83 para *P. gingivalis*, 0,38 para *P. intermedia* e 0,67 para *T. forsythensis*. Sobretudo, os autores concluíram que a concordância entre ambos os métodos testados foi excelente para *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, regular para *T. forsythensis* e pobre para *F. nucleatum* e *P. intermedia*. A discrepância nos resultados pode ser explicada pela inabilidade dos métodos de cultura em distinguir entre a proximidade filogenética das espécies, e os problemas em manter as bactérias viáveis, os quais são requeridos para um cultivo padrão.

Para NONNENMACHER et al.⁸¹, 2005, acurados testes de laboratório para detecção e quantificação de periodontopatógenos em amostras de placa subgengival de pacientes com doença periodontal, estão se tornando essenciais para o estudo da patogênese desta condição polimicrobiana. Os autores avaliaram por meio de Real-Time PCR para obter-se a quantificação de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Dialister pneumosites*, *C. rectus* e *Micromonas micros*, assim como o número total de eubactérias em amostras de placa subgengival de indivíduos com periodontite. 83 amostras subgengivais de pacientes periodontalmente doentes e 43 amostras de indivíduos periodontalmente saudáveis foram testadas e os resultados da quantificação das bactérias, correlacionados a parâmetros clínicos. A quantificação foi realizada com seqüências alvo específicas 16S rRNA por meio de sondas marcadas com dupla fluorescência e diluições seriadas de plasmídeos padronizadas por Real-Time PCR. Os resultados demonstraram que os pacientes, assim como, os indivíduos saudáveis apresentaram-se positivos para a presença dos periodontopatógenos; entretanto, os valores médios estavam mais elevados nas amostras de indivíduos com periodontite. Adicionalmente, uma associação positiva foi observada entre a colonização em altos níveis por *P. gingivalis* e *Micromonas micros* e a presença de bolsas periodontais profundas. Estes resultados permitiram aos autores concluir que a Real-Time PCR constitui um método de alta sensibilidade para quantificação de periodontopatógenos e pode ser útil para o entendimento da complexa etiologia observada nas doenças periodontais.

De acordo com SAKAMOTO; UMEDA; BENNO¹⁰¹, 2005, a aplicação de métodos moleculares, principalmente os baseados na porção ribossômica 16S RNA (rRNA), permite ao pesquisadores contornar a etapa de cultivo e tem provado sua utilidade em estudos da composição microbiana em vários ecossistemas, inclusive na cavidade oral humana. Em sua pequena revisão os autores descrevem o impacto destas abordagens cultura-independente sobre nosso conhecimento da cavidade oral e fornece diretrizes para estudos futuros que deverá enfatizar o papel de cepas específicas, espécies e grupos de microorganismos na doença periodontal. Recentes pesquisas foram resumidas

para elucidar a relação entre a doença periodontal e a microbiota oral humana, incluindo organismos até agora não cultiváveis. O método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR) foi desenvolvido para detectar e quantificar bactérias periodontopatogênicas, tais como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* e *T. denticola*. A técnica do “checkerboard DNA-DNA hibridization” permitiu a enumeração de um grande número de espécies em um grande número de amostras. A análise de uma biblioteca de clones de 16s rRNA revelou a diversidade da microbiota oral humana e a existência de organismos ainda a serem cultivados, que até então eram apenas presumidamente patógenos periodontais. Em adição, o exame dos polimorfismos terminais analisados por restrição de fragmentos (TRFLP) foi aplicado para avaliação da diversidade da microbiota oral humana. Assim concluem que abordagens cultura-independente são úteis para o estudo da ecologia microbiana da cavidade oral e deverá ser mais útil ainda no futuro para elucidar a etiologia da doença periodontal.

Em seu artigo BOUTAGA et al.¹², 2006, informam que para a análise da placa subgengival, a cultura de bactérias anaeróbicas tem sido o padrão ouro por muitos anos. Recentemente, técnicas de microbiologia molecular tem-se tornado disponíveis para identificar e quantificar organismos alvos com alta especificidade e sensibilidade. A técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR) fornece uma nova ferramenta para detectar patógenos orais em ambos, infecções bucais e não-bucais em humanos. Assim, o objetivo de seu estudo foi comparar a Real-Time PCR e cultura anaeróbica para, detectar e quantificar 6 periodontopatógenos em periodontos saudáveis e doentes. Em posse de amostras de placa subgengival de 259 pacientes adultos com periodontite e 11 controles saudáveis, foram realizadas análises através de cultura anaeróbica quantitativa e Real-Time PCR quantitativo para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *Micromonas micros* e *Fusobacterium ssp.* Os resultados demonstraram que todas as espécies foram mais freqüentemente isoladas em pacientes do que em controles para ambos os métodos. *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *Micromonas micros* apresentaram-se significativamente

evidenciados na doença nas duas técnicas. *P. intermedia* foi significativamente associada à periodontite somente pela Real-Time PCR (OR 9.7), enquanto que o *A. actinomycetemcomitans* demonstrou relação significante somente através da cultura. A diferença crítica entre cultura e Real-Time PCR foi para amostras cultura-negativa/Real-Time PCR-positiva as quais totalizaram 7% para *A. actinomycetemcomitans*, 3% para *P. gingivalis*, 7% para *T. forsythensis*, 20% para *P. intermedia*, 6% para *Micromonas micros*, e 0,8% para *Fusobacterium ssp.*, nos pacientes com periodontite e 12%, 3%, 2%, 35%, 14% e 0%, respectivamente, no grupo periodontalmente saudável. Além disso, os indivíduos com periodontite tinham significativamente maiores quantidades de todos os tipos de bactérias testadas em suas amostras de placa subgingival quando comparados com os indivíduos saudáveis. Em posse de seus resultados, os autores concluíram que a Real-Time PCR resulta em uma nova ferramenta para um rápido diagnóstico e abre uma oportunidade para detectar patógenos orais em pequeno número nos espécimes clínicos, os quais podem estar sob detecção limitada pela técnica da cultura.

2.6 Saliva como fonte de bactérias

O estudo de UMEDA et al.¹²⁴, 1998, comparou a presença de 6 bactérias periodontopatogênicas na saliva e placa subgingival de 202 indivíduos. As bactérias testadas foram identificadas utilizando PCR baseada em 16S rRNA. Cada indivíduo avaliado contribuiu com uma amostra de saliva e uma amostra em ponta de papel da mistura retirada da bolsa periodontal mais profunda de cada quadrante da dentição. O teste kappa revelou uma leve concordância entre a presença de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, e *T. denticola* nas amostras de saliva e bolsa periodontal (kappa > 0,4). O teste McNemar demonstrou que a diferença entre os tipos de amostra foi devido à detecção mais freqüente dos 3 organismos na saliva do que nas amostras da bolsa periodontal ($p < 0,01$). *P. nigrescens* também foi mais frequentemente detectada na saliva do que nas amostras da bolsa periodontal. ($p < 0,01$; Teste de McNemar). Embora uma pequena concordância tenha sido encontrada para *A. actinomycetemcomitans* e *B. forsythus* (kappa $\leq 0,4$), nem a saliva nem as amostras da bolsa demonstraram melhor detecção para estas duas espécies (p

< 0,01; Teste de McNemar). Os resultados indicaram que a saliva é superior à amostra da mistura das bolsas periodontais para detectar *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. denticola* na cavidade oral. A detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *B. forsythus*, com razoável exatidão, pode requerer ambos, saliva e amostras de bolsa periodontal.

De acordo com MURDOCH-KINCH⁷², 1999, no final do século 20 o computador e a biologia molecular facilitaram um maior progresso na medicina e odontologia. Na odontologia, os métodos clínicos emergentes, potencialmente melhoraram o diagnóstico precoce de cáries dentárias, doenças gengivais e câncer oral. Em adição, a saliva demonstrou um potencial excelente como substituto para o sangue nos exames para o diagnóstico de doenças sistêmicas e orais. A tecnologia de utilizar fragmentos de DNA, um novo sistema que combina outras tecnologias, tem se mostrado de valor tanto na medicina como na odontologia. Assim conclui prognosticando que, para cada uma das três enfermidades mais comuns na cavidade oral, os novos métodos de diagnóstico que estão surgindo, serão de grande utilidade na prática odontológica no século 21.

Para examinar a ocorrência de bactérias periodontais específicas em crianças e adolescentes, OOSHIMA et al.⁸⁴, 2003, examinaram 10 supostas bactérias periodontais, longitudinalmente, em amostras de placa e saliva de 119 crianças periodontalmente saudáveis (2 a 15 anos) utilizando a PCR. Os resultados apontaram para a detecção freqüente de *C. ochracea*, *C. sputigena* e *A. actinomycetemcomitans* na saliva, e para a tendência de permanecerem na saliva pelo tempo em que durou o estudo, enquanto que *P. gingivalis*, *T. denticola* e *P. intermedia* raramente foram detectadas. *P. nigrescens* foi mais frequentemente detectada na placa e sua prevalência aumento com a idade. *E. corrodens* e *C. rectus* algumas vezes foram detectadas em ambas, placa e saliva, enquanto que *T. forsythensis* foi ocasionalmente evidenciada na saliva. Dessa forma foi possível concluir que *A. actinomycetemcomitans*, *C. ochracea*, *C. sputigena*, *P. nigrescens*, *C. rectus* e *E. corrodens* são membros comuns da flora microbiana oral de crianças saudáveis, ao passo que *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *T. denticola* parecem ser organismos transitórios.

Amostras de saliva de 16 crianças com cáries ativas foram investigados por RUPF et al.⁹⁸, 2003, para *Streptococcus mutans* usando três tipos diferentes de técnicas de PCR, e seus resultados foram comparados à cultura seletiva em agar mitis salivarius com bacitracina (MSB). Grupos I e II – PCR competitiva com análise no último ciclo; III – análise cinética em tempo real por LightCycler; IV e V - PCR competitiva com análise no último ciclo por “block cycler”; VI – cultivo em agar MSB. Nos grupos I, III, IV e VI as amostras de saliva foram analisadas diretamente. Um preparo do DNA com a adição de competidores, antes da PCR, foi realizado nos grupos II e V para excluir a influência de inibidores da PCR. Os coeficientes de correlação variaram entre 0,97 a 0,98 para os métodos PCR competitivos, 0,8 a 0,85 para competitiva vs. Real-Time PCR e 0,5 a 0,65 para PCR vs. método de cultivo. A partir desses resultados, os autores inferiram que a PCR competitiva, em relação à em tempo real, foi mais rápida e sensível, porém menos reprodutível do que a “block cycler”.

Para NG et al.⁷⁷, 2004, a saliva é considerada uma fonte de DNA genômico extremamente útil para estudos genéticos, uma vez que é possível realizar sua coleta de uma forma não invasiva e sem dor. Dessa forma, almejam, com este estudo, determinar se diferentes condições de armazenamento das amostras de saliva tinham impacto na capacidade de extração de DNA genômico e se este apresentava em condições, com qualidade, para o uso em PCR. A saliva foi coletada de voluntários saudáveis e alíquotas de 2 mL foram submetidas a diferentes condições de estocagem: (S1) lavagem da saliva usando tampão fosfato salino (PBS) e extração do DNA no mesmo dia da coleta; (S2) lavagem e centrifugação para formar um “pellet”, o qual era estocado à -70° C por uma semana previamente a extração do DNA; (S3) armazenamento de toda a saliva à 4° C por 7 dias, seguido por lavagem e extração de DNA; (S4) estocagem à 4° C por 7 dias, seguido por lavagem e formação de “pellet”, o qual era armazenado à -70° C por 1 mês antes da extração do DNA; (5) estocagem à -70° C por 1 mês, seguido de lavagem e extração do DNA. A formação do DNA e sua pureza eram determinadas por espectrofotometria entre 260 e 280 nm. Cerca de 20 ng DNA genômico eram utilizados para a PCR, e o resultado (banda do PCR) era capturado por

fotografia digital e quantificado. Os resultados apresentados demonstraram que a quantidade de DNA extraído de 2mL de saliva variou amplamente em função das diferentes condições de armazenamento, enquanto que a pureza da extração do DNA, baseada na relação OD 260/280, foi boa e comparável. A PCR resultou na presença de um único produto específico de tamanho correto em todas as amostras independentemente das condições de armazenamento. A quantificação das bandas da PCR demonstrou diferenças significantes entre as várias condições de estocagem ($p < 0,05$). Comparadas à S1, as bandas da PCR em S2 e S3 não eram tão fortes, enquanto que as amostras amplificadas de S4 e S5 foram as mais fracas. Análises posteriores demonstraram que a média para as condições S4 e S5 foram significativamente diferentes de S1-S3. Qualitativamente, resultados semelhantes foram obtidos quando a PCR foi repetida. Assim, concluíram que a saliva pode trabalhar como uma fonte útil de DNA genômico, mesmo quando armazenada em condições inferiores àquelas consideradas ótimas.

De acordo com os autores a saliva é uma fonte potencialmente útil, mas inexplorada, de DNA para estudos epidemiológicos genéticos. No entanto, os métodos atuais estão principalmente preocupados com a extração do DNA e não se ocupam com a preservação e estocagem, igualmente importantes. Assim, NG et al.⁷⁸, 2006, avaliaram como as várias condições de armazenamento poderiam afetar o rendimento e qualidade deste DNA, obtido utilizando os novos métodos disponíveis que se propunham a fazê-lo em um único kit. As condições que envolviam a extração do DNA imediatamente após a coleta da saliva (condição I) ou quando armazenada em sala refrigerada a ar condicionado (20° C) por 1 mês (condição II) e 6 meses (condição III) assim como a -80° C por 6 meses (condição IV). O efeito incorporado devido a uma incubação adicional das amostras de saliva à 30° C por 2 semanas também foi avaliado. A média geral de rendimento de DNA para 2 mL de saliva foi de 35,5 µg (8,5-85,2 µg). O rendimento do DNA não foi afetado pela incubação da saliva à 30° C, mas este rendimento sob a condição III foi significativamente maior comparado às condições I e II. Os valores de densidade óptica (OD_{260/280}) são aceitáveis e comparáveis em todas as circunstâncias. As diferentes condições de armazenamento não causaram impacto na qualidade

do DNA nos experimentos de Real-Time PCR e a fidelidade genotípica permaneceu inalterada. Em posse destes dados, permitiram-se concluir que a saliva é uma fonte viável e alternativa de DNA genômico humano para estudos genéticos epidemiológicos e, que estes novos métodos e outras possíveis técnicas relacionadas podem ser meios efetivos para este fim.

O uso da saliva virgem tem-se mostrado promissor na detecção do *A. actinomycetemcomitans* fora do ambiente subgengival. Assim, este estudo de CORTELLI et al.¹⁶, 2005, teve a intenção de avaliar o uso de saliva não estimulada na detecção desta bactéria e comparar à ocorrência subgengival e extrasulcular deste patógeno em indivíduos brasileiros com periodontite crônica. Sessenta e seis pacientes (média de idade 38,01±9,28 anos) com avançada periodontite crônica generalizada foram avaliados. Amostras de placa subgengival foram colhidas de 8 sítios de cada paciente, das bolsas mais profundas de cada quadrante. Amostras das superfícies mucosas do dorso da língua e bochechas foram recolhidas com “cotonetes” e armazenadas em um microtubo estéril contendo uma solução redutora. Amostras de saliva não estimulada também foram coletadas em tubos estéreis de 0,1 mL de saliva intacta, a qual foi diluída em 1 mL de solução redutora. A presença de *A. actinomycetemcomitans* foi estabelecida utilizando a cultura bacteriana em meio seletivo agar soja acrescido de bacitracina e vancomicina (TSBV). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para diferenciar cepas altamente leucotóxicas das mais amenas nos pacientes que apresentaram o patógeno em pelo menos dois sítios amostrados. Os resultados obtidos demonstraram que o *A. actinomycetemcomitans* foi isolado em 63,63% das amostras subgengivais, 56,06% das amostras de saliva e 45,45% das amostras das superfícies mucosas. Não foi observada diferença estatística entre as amostras subgengivais e salivares em relação à ocorrência de microorganismos. A regressão linear evidenciou uma associação entre placa subgengival e saliva ($r(2) = 0,897$; $p = 0,015$) e membranas mucosas e saliva ($r(2) = 0,152$; $p = 0,024$). O mesmo perfil leucotóxico foi observado em todas as amostras de um mesmo paciente. Dessa forma, os resultados sugeriram que na periodontite avançada, a saliva não estimulada é uma mistura

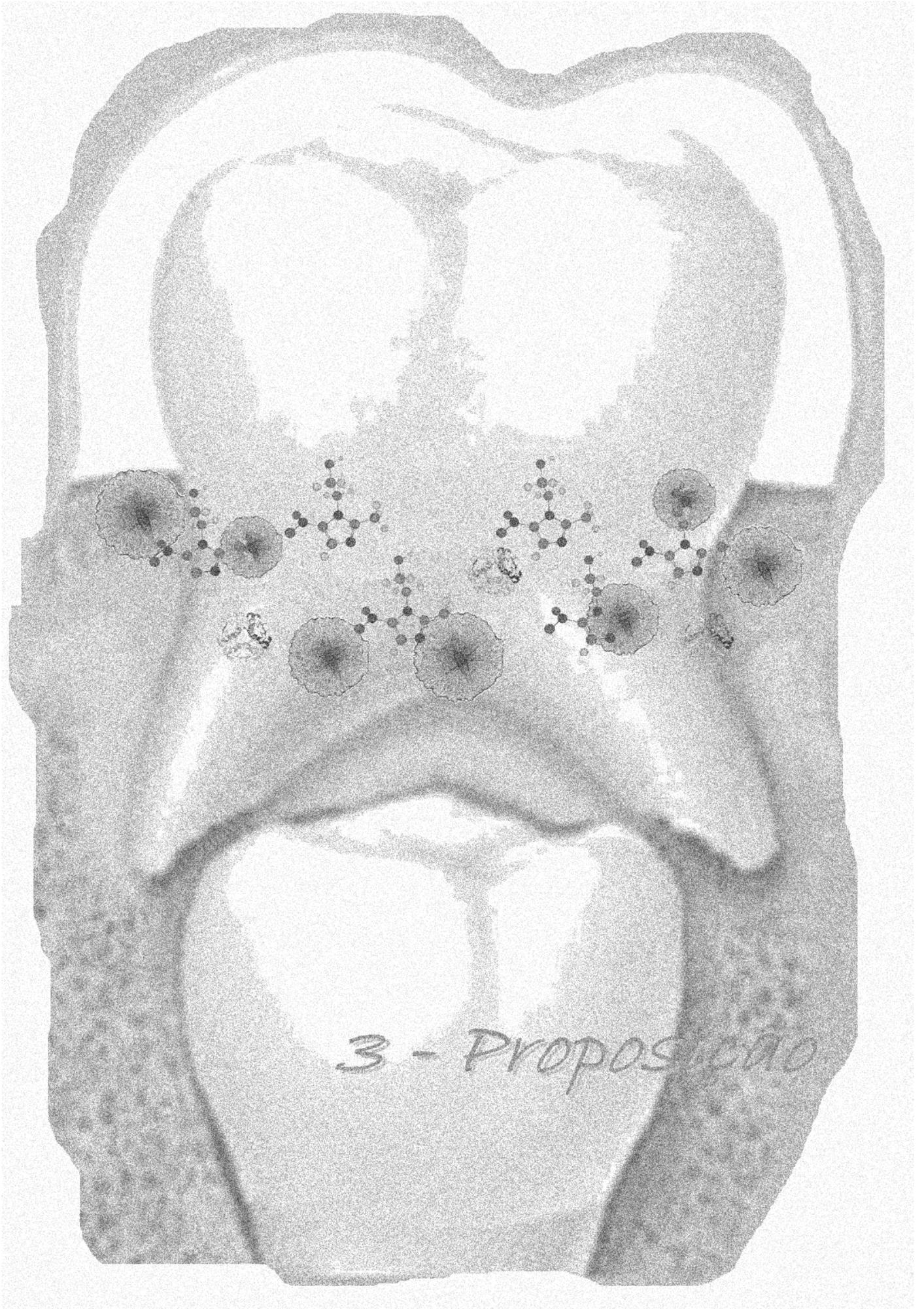
representativa de amostras de placa subgengival e seu uso é apropriado para detecção oral de *A. actinomycetemcomitans*.

SAWAMOTO et al.¹⁰⁵, 2005, avaliaram os níveis de bactérias periodontopatogênicas e 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) em pacientes com periodontite. Os níveis salivares de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *B. forsythus* foram avaliados utilizando a Real-Time PCR. Os níveis de 8-OHdG foram determinados através de ELISA. Encontrou-se níveis salivares de 8-OHdG, *P. gingivalis* e *B. forsythus* em pacientes com periodontite significativamente maiores do que em pacientes saudáveis. Em contraste, o nível de *A. actinomycetemcomitans* em pacientes saudáveis foi maior que em pacientes doentes. 8-OHdG foi significativamente correlacionado com *P. gingivalis*. Decréscimos estatisticamente significativos nos níveis de *P. gingivalis*, profundidade de sondagem, sangramento à sondagem e 8-OHdG, foram observados após o início do tratamento. Assim, os resultados sugeriram que os níveis salivares de 8-OHdG refletiam a carga de periodontopatógenos e que estes poderiam ser um biomarcador útil para avaliar o estado periodontal acuradamente, e também para avaliar a eficácia do tratamento periodontal.

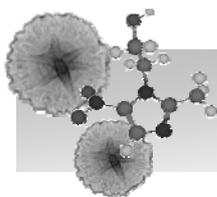
O objetivo do estudo de BEIKLER et al.⁹, 2006, foi identificar uma estratégia de amostragem, com alta probabilidade, para identificar a colonização por *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. denticola*, antes e subsequente à terapia periodontal mecânica. Amostras foram retiradas dos seguintes sítios intra-orais de 35 pacientes com periodontite crônica não tratada, antes e após um mês e meio, 3 e 6 meses de terapia periodontal não-cirúrgica: placa supra e subgengival da bolsa mais profunda de cada sextante; uma mistura de placa supra e subgengival de outras seis bolsas aleatoriamente selecionada, em dentes menos afetados; esfregaços de mucosa da língua, tonsilas, garganta; e saliva estimulada e não estimulada. As espécies microbianas foram identificadas por PCR. De todas as amostras de todos os sítios avaliados, a maior probabilidade de detectar simultaneamente os patógenos avaliados foi encontrada na combinação entre placa supra e subgengival nas amostras removidas do dente mais afetado em cada sextante dos pacientes não tratados

(probabilidade: 83% a 95% para as baterias avaliadas). Estes resultados foram observados consistentemente durante todo o período do estudo. Em conclusão, foi sugerido que para determinar o estado intra-oral dos pacientes com de periodontite, em relação a portar bactérias periodontopatogênicas, uma amostra combinada de placa supra e subgengival retirada de bolsas periodontais mais profundas em cada sextante, poderá fornecer os resultados mais confiáveis, e esta estratégia de amostras poderá ser utilizada como rotina em testes microbiológicos e pesquisas clínicas.

Os autores haviam previamente demonstrado que o mRNA humano estava presente na saliva e poderia ser utilizado como um biomarcador de câncer oral. Neste estudo, PARK et al.⁸⁶, 2006, analisaram a integridade, fontes e estabilidade de RNA salivar. Mediram a integridade do RNA salivar por meio da transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) ou de RT-quantitativa PCR (RT-qPCR). Para estudar os sítios de entrada do RNA no interior da cavidade oral, utilizaram a análise da RT-PCR do Rna salivar das 3 maiores glândulas salivares, fluido do sulco gengival e células do epitélio oral descamadas. Mediram a estabilidade do mRNA salivar beta-actina através de RT-qPCR incubado à temperatura ambiente em diferentes períodos de tempo. A associação do RNA com outras moléculas foi medida pela filtragem da saliva através de poros de diferentes tamanhos antes de realizar a RT-qPCR. Para avaliar a interação de RNA-macromoléculas, incubou-se saliva com Triton X-100 por diferentes períodos de tempo antes da RT-qPCR. Na maior parte dos casos, detectaram mRNAs salivares parciais e de extensão total e quantias menores de amplicons do meio e 3' gene, comparados com 5'. O RNA estava presente em todos os fluidos orais examinados. mRNA salivar endógeno beta-actina degradou mais devagar do que o exógeno, com meia-vida de 12,2 e 0,4 min., respectivamente ($p < 0,001$). O RNA salivar não conseguiu passar através de poros com 0,22 ou 0,45 μm . A incubação da saliva com triton X-100 acelerou a degradação do RNA salivar. Em conclusão, sugeriram que a saliva abriga ambas as formas degradadas de mRNA, extensão total e parcial; o RNA abrigado na cavidade oral procede de diferentes fontes, e a associação com macromoléculas pode proteger o RNA salivar da degradação.



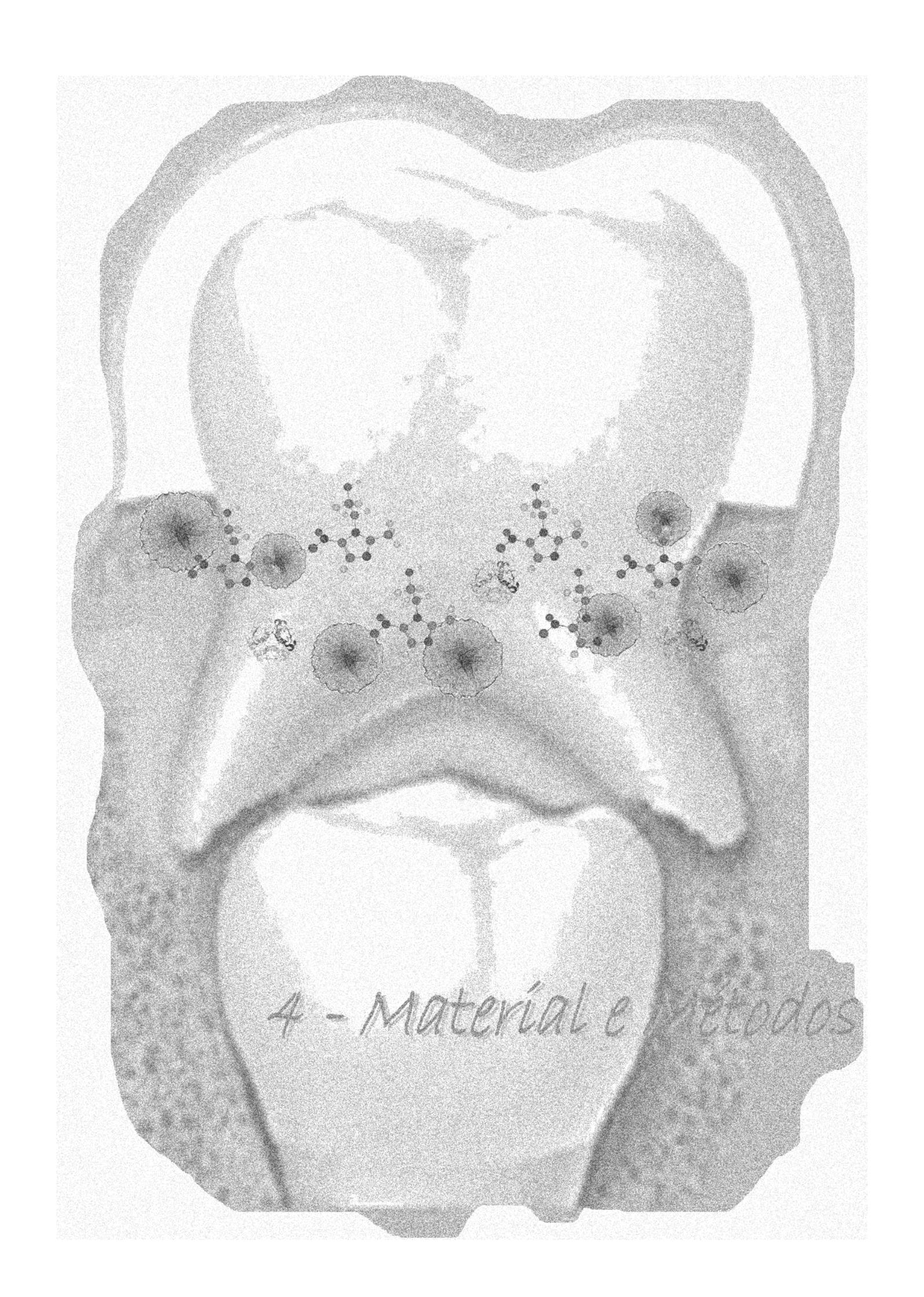
3 - PROPOSICAO



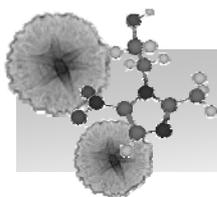
3 - PROPOSIÇÃO

Este estudo longitudinal propôs-se a estudar crianças portadoras de Diabetes mellitus insulino-dependente ou do tipo I, durante 1 ano, antes e após a utilização de um gel de metronidazol 25% em substituição a uma das escovações diárias, por um período de 14 dias, com os objetivos de:

- Φ Identificar a presença de *A. actinomycetemcomitans* precocemente nos indivíduos estudados.
- Φ Verificar a ação do gel de metronidazol 25% sobre a contagem de *A. actinomycetemcomitans*.
- Φ Verificar a ação do gel de metronidazol 25% sobre os índices de:
 - φ Placa
 - φ Gengival
 - φ Profundidade de sondagem

The image shows a decorative page with a scalloped border. In the center, there is a faint map of the Americas. Below the map, there is a molecular structure diagram consisting of several interconnected rings of atoms, represented by small black dots connected by lines. The diagram is positioned in the middle of the page, between the map and the text.

4 - Material e Métodos



4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos pacientes e coleta de amostras

Cumpridas as etapas pertinentes à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP (ANEXO A), foram selecionadas 50 crianças entre 3 e 12 anos, com dentadura decídua ou mista, portadoras ou não de IDDM, que não tivessem feito uso de antibióticos nos 6 meses anteriores ao estudo. Dividiu-se os participantes em dois grupos, grupo D composto por crianças portadoras de IDDM e grupo ND composto por crianças não portadoras de IDDM. O número final de participantes, após 1 ano de acompanhamento, foi de 14 para o grupo D e 18 para o grupo ND, devido às perdas ao longo do estudo.

Ao início do estudo (T0), antes da instituição da terapia, foram colhidas amostras de saliva e registrados os índices de placa, gengival e de profundidade de sondagem das crianças em ambos os grupos.

A seguir, para os dois grupos foi fornecido um gel de metronidazol 25% (Tabela 1), formulado pelo Laboratório de Manipulação da Pharmacia Specifica – Bauru/SP, de acordo a manter suas características terapêuticas sem, no entanto, apresentar riscos para os indivíduos^{66, 67, 69, 89, 126}.

Tabela 1 – Composição do gel de metronidazol 25% (peso/peso)

Componente	Quantidade
Metronidazol (na forma de benzoato)	25%
Óleo de gergelim	30%
Óleo de rícino hidrogenado PEG 40	15%
Poliacrilamida isoparafina e laureth 7	1%
Água destilada q.s.p.	100g

* não houve adição de agentes antimicrobianos preservantes para não interferir no resultado do estudo

Nenhuma orientação de higiene bucal, inicialmente, foi dada aos participantes da amostra, evitando assim algum possível viés no estudo. Apenas receberam orientação para substituir o creme dental usual pelo gel formulado em uma das escovações diárias, preferencialmente a escovação efetuada após o almoço, sendo esta realizada da maneira como a criança e/ou os pais ou responsáveis estavam acostumados a efetuar previamente ao início dos trabalhos. Mesmo para aquelas crianças, as quais um adulto responsável realizava sua higiene bucal, esta rotina foi mantida. Esta escovação, uma vez ao dia, foi mantida pelo período de 14 dias analogamente ao protocolo de utilização de utilização do Elyzol 25% Dental Gel¹⁵, cuja formulação é semelhante à empregada neste estudo. Lembrando que, de acordo com o fabricante, o Elyzol 25% Dental Gel deve ser utilizado diretamente na bolsa periodontal duas vezes, com intervalo de uma semana (0 e 7 dias)¹⁵.

Passado o período de 14 dias estipulado para o uso do gel, foram colhidas novamente amostras de saliva e registrados os índices de placa, gengival e profundidade de sondagem de ambos os grupos.

Finalizada a etapa experimental de utilização do gel de metronidazol 25%, os pacientes foram orientados a retornarem para sua rotina de escovação e passaram a receber somente informações básicas sobre saúde bucal a cada retorno. Estes retornos ocorreram imediatamente após os 14 dias (15^o dia), 30 dias, 3 meses, 6 meses e 1 ano após a etapa experimental.

Os índices de placa dentária (IP), gengival (IG) e a profundidade de sondagem (PS) em mm, foram registrados de acordo com LÖE⁵⁶, 1967. Estes foram avaliados e registrados por um único examinador previamente calibrado (Kappa 0,78), antes do uso do gel (T0) e nas leituras seguintes (15 dias, 30 dias, 3 meses, 6 meses e 1 ano após a etapa experimental).

A coleta da saliva, não estimulada, foi efetuada sem a realização de profilaxia prévia. A criança expectorava a saliva em um frasco estéril do tipo Becker o suficiente para que fosse possível a retirada, por meio de pipeta e ponteira estéril, de 1mL total de cada paciente, armazenando-a em tubo de microcentrifuga de 1,5mL estéril e estocando este tubo em freezer à temperatura de -20° C até o momento da extração do DNA.

4.2 Extração do DNA bacteriano das amostras de saliva

A extração do DNA bacteriano das amostras de saliva foi realizada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, seguindo o protocolo descrito por SAKAI⁹⁹, 2002, com a utilização de InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories. Inc., Hercules, CA, USA), para extração de DNA bacteriano a partir de saliva, procedimento descrito no APÊNDICE A. Este DNA extraído foi utilizado posteriormente para a análise quantitativa da presença de periodontopatógenos através da amplificação por meio da técnica Real-Time PCR.

4.3 Real-Time PCR

A detecção do *A. actinomycetemcomitans* foi realizada por meio da técnica de Real-Time PCR, baseada na técnica de PCR convencional utilizada em estudos anteriores^{99, 100}, onde foi empregado um par de primers específico (forward: 5'-AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC-3'; reverse: 5'-ATGCCAACTTGACGTAAAT-3') para a detecção da bactéria estudada, e que delimitou o fragmento de 557 pares de base do DNA bacteriano a ser amplificado, para identificação do microrganismo presente nas amostras de saliva. Para a realização da curva padrão que serviu de parâmetro de comparação do estudo, utilizou-se uma cepa pura deste patógeno, sendo esta cultivada pelo pós-graduando Rafael Nóbrega Stipp e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, ambos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicada/UNICAMP, utilizando protocolo descrito no APÊNDICE B. A curva aqui determinada apresentou sensibilidade de detecção entre $1 \times 10^{(-2)}$ a $1 \times 10^{(7)}$ UFC de *A. actinomycetemcomitans*.

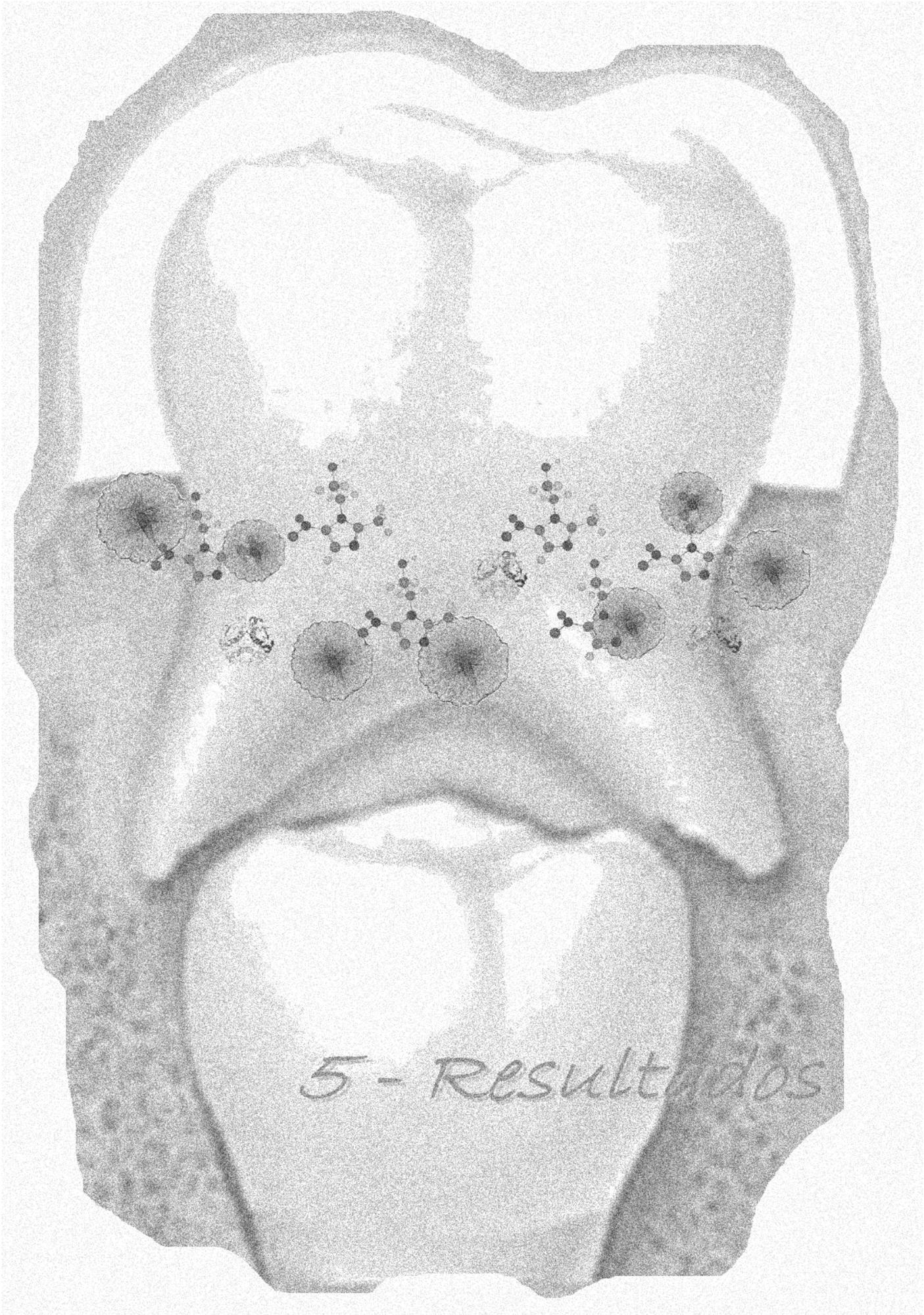
A realização da Real-Time PCR foi executada no Laboratório de Imunoparasitologia Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, onde a quantificação bacteriana presente nas amostras de saliva dos participantes, em todas as etapas do estudo, foi analisada por meio de reações em triplicata, utilizando-se o sistema SYBRGreen em um aparelho ABI7000 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) de acordo com estudos anteriores^{28,29}.

Os primers descritos anteriormente se mostraram adequados a tais reações, sendo utilizados para a realização dos ensaios de Real-Time PCR. Estes primers se mostraram eficientes nas condições anteriormente descritas tanto no que diz respeito às concentrações ideais de cada par de primers quanto à temperatura de anelamento. O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras (por meio do termociclador ABI7000 associado ao Software ABI Prism, Applied Biosystems) através da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação nucleases fluorogênicas (SYBRGreen 1) aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ou ciclo limiar). Este é o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação das amostras, atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da bactéria estudada. O Ct encontrado foi comparado aos valores de Ct de uma curva padrão construída com amostras contendo uma concentração de DNA equivalente a $1 \times 10^{(-2)}$ a $1 \times 10^{(7)}$ UFC de *A. actinomycetemcomitans*. Resumidamente, Ct é o ponto no qual o sinal de fluorescência apresenta um aumento exponencial e cruza um limiar arbitrário da intensidade de fluorescência (geralmente 10 vezes maior que o nível de corte “background”).

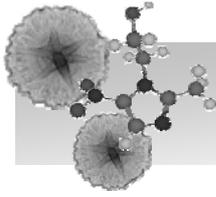
Para as reações de Real-Time PCR foram utilizados 12,5 µL do reagente SYBRGreen Master Mix (Applied Biosystems; que contém o fluoróforo SYBRGreen 1); a enzima polimerase AmpliTaq Gold; DNTPs; o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência (e os demais componentes de tampão, já devidamente otimizados), 5ng de DNA, 1µL da solução contendo 0,4 µM de primer e água MiliQ tratada com DEPC para completar o volume de 25 µL de reação. A reação de amplificação (PCR) compreendeu basicamente 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 56° C e 2 min a 72° C. Houve também um ciclo final de vinte minutos, com temperatura crescente de 60 a 95° C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação, tendo em vista a temperatura de “melting” de 78° C do fragmento de amplificação de 557 pares de base.

Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de 16S r-RNA, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação (forward: 5'-CGGCAAGCTAATCTCTGAAA-3'; reverse: 5'-GCCCCTAAAAGGTTACCTCA-3'; com produto de amplificação de 190 pb, 56°C de temperatura de anelamento e 75°C de temperatura de "melting"), e todas se mostraram positivas para a presença de DNA bacteriano. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos primers utilizados. Para as reações de Real-Time PCR foram utilizadas amostras, de cada indivíduo, contendo 5 ng de DNA proveniente da saliva coletada nos tempos T0, 15 dias, 30 dias, 3 meses, 6 meses e 1 ano após o uso do gel testado.

Os resultados clínicos obtidos foram tabulados e submetidos à Análise de Variância a dois critérios e Teste de Tukey, adotando-se um nível de significância de 5%, com intervalo de confiança de 95%, pelo programa *Statistica* versão 5.1 (StatSoft Inc., Tulsa, USA), considerando o número final de participantes que terminaram o estudo em 1 ano. Os resultados referentes à quantificação microbiológica, obtidos por meio das reações em triplicata da Real-Time PCR para cada amostra de saliva, foram apresentados em forma de média \pm dp das leituras individuais. Em função de poucos participantes terem se mostrados positivos para a detecção do *A. actinomycetemcomitans*, foram avaliados pela Análise Descritiva dos dados obtidos para cada indivíduo.



5 - Resultados



5 - RESULTADOS

5.1 Resultados clínicos

Após o registro dos dados referentes a 1 ano de avaliações clínicas, com um número final igual a 14 participantes para o grupo diabéticos (D) e 18 para o grupo não diabéticos (ND), estes foram tabulados. O valor médio para cada índice clínico (IP – índice de placa, IG – índice gengival, PS – profundidade de sondagem) de cada grupo foi calculado, e a média dos grupos foi avaliada pela Análise de Variância a dois critérios (diferentes grupos e diferentes fases de avaliação) e, quando apresentada diferença estatisticamente significativa, submetidas ao Teste de Tukey para comparação. Para análise estatística utilizou-se o programa *Statistica* versão 5.1 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Os resultados estão apresentados nas tabelas e figuras a seguir.

5.1.1 Índice gengival

Tabela 2 – Índice gengival ($\bar{x} \pm dp$) para ambos os grupos ao longo do estudo

FASE	T0	15 dias	30 dias	3 meses	6 meses	1 ano
D	0,969 ±0,213	0,377 ±0,109	0,446 ±0,244	0,443 ±0,123	0,559 ±0,109	0,966 ±0,174
ND	0,833 ±0,281	0,407 ±0,159	0,388 ±0,170	0,414 ±0,257	0,529 ±0,231	0,828 ±0,265

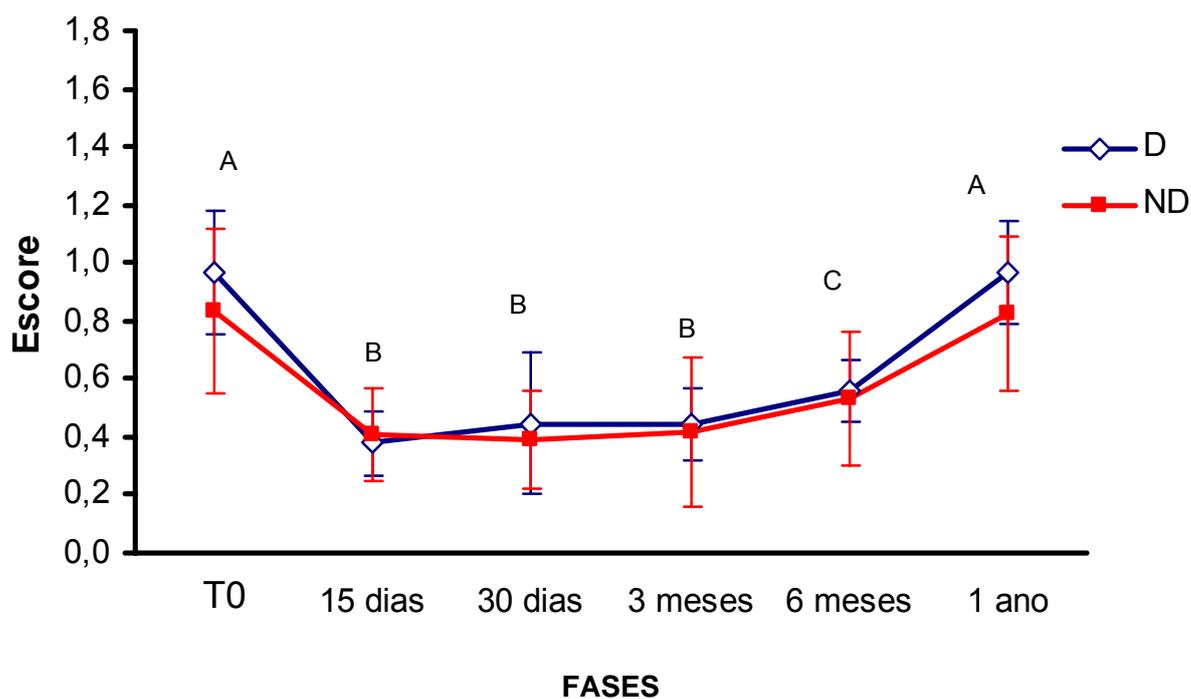


Figura 1 – Índice gengival em 1 ano de avaliação (escore 0-3), para os grupos D e ND – letras iguais não possuem diferença estatisticamente significativa. entre si.

Quadro 1 – ANOVA a 2 critérios (diferença entre grupos e fases)

ANOVA	Valor de p
Grupos	0,297
Fases	0,000*
Interação	0,158

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

De acordo com o teste ANOVA a 2 critérios, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre as diferentes fases de leitura do IG, não havendo diferença entre os grupos estudados nem interação dos critérios avaliados.

Quadro 2 - Teste de Tukey para comparação entre as fases de leitura.

FASE	\bar{x}
T0	0,901 ^A
15 dias	0,392 ^B
30 dias	0,417 ^B
3 meses	0,428 ^B
6 meses	0,544 ^C
1 ano	0,897 ^A

letras iguais não possuem diferença estatisticamente significativa entre si. ($p < 0,05$)

De acordo com os resultados verificados, podemos inferir que o valor de IG obtido para o T0 apresentou-se significativamente maior que as leituras de 15, 30, 90 e 180 dias, exceto para a leitura de 1 ano, que demonstrou-se próxima do valor medido inicialmente. As leituras de 15 dias, 30 dias e 3 meses apresentaram-se sem diferença estatisticamente significativa entre si, e menores que a leitura T0. A leitura aos 6 meses apresentou-se, com significância estatística, maior que as leituras aos 15 dias, 30 dias e 3 meses, porém ainda menor que a leitura T0. E ao final do estudo, a leitura de 1 ano apresentou-se com significância estatística em relação às anteriores, porém sem diferença em relação à leitura T0.

5.1.2 Índice de placa

Tabela 3 – Índice de placa ($\bar{x} \pm dp$) para ambos os grupos ao longo do estudo

FASE	T0	15 dias	30 dias	3 meses	6 meses	1 ano
D	1,568 ±0,513	0,764 ±0,303	0,678 ±0,273	0,758 ±0,247	0,645 ±0,282	1,142 ±0,282
ND	1,317 ±0,475	0,666 ±0,350	0,680 ±0,315	0,598 ±0,370	0,699 ±0,335	0,992 ±0,302

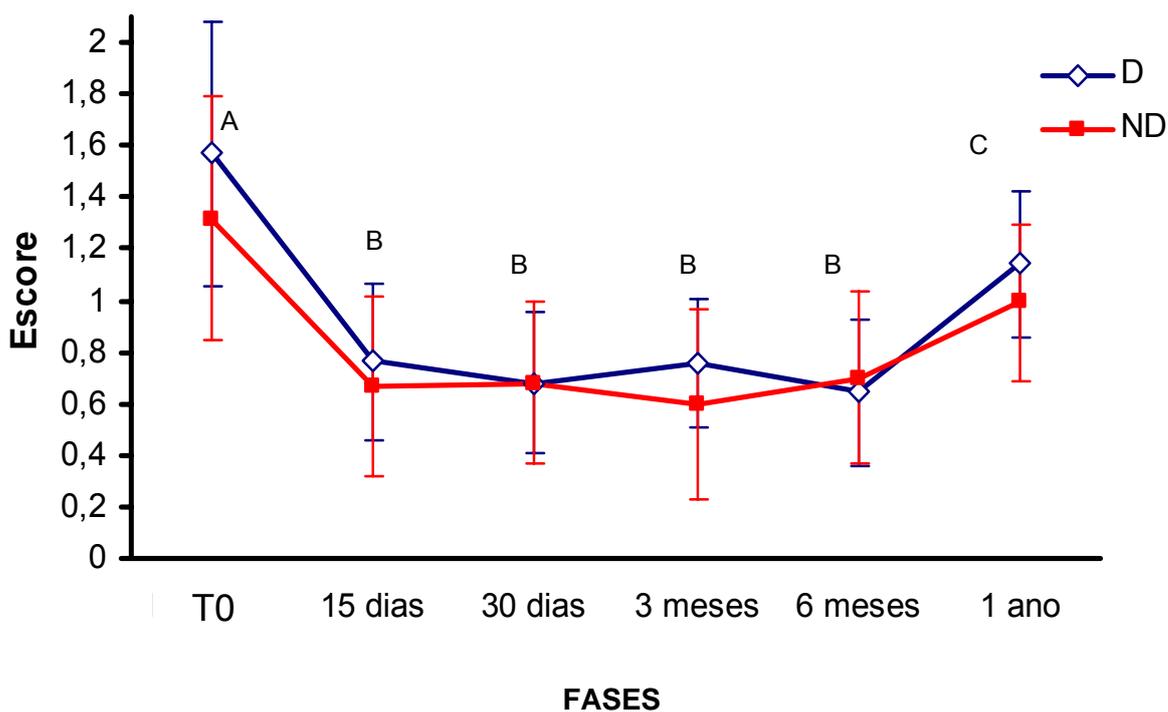


Figura 2 – Índice de placa em 1 ano de avaliação (escore 0-3), para os grupos D e ND – letras iguais não possuem diferença estatisticamente significativa entre si.

Quadro 3 – ANOVA a 2 critérios (diferença entre grupos e fases)

ANOVA	Valor de p
Grupos	0,314
Fases	0,000*
Interação	0,117

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

De acordo com o teste ANOVA não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém há diferença estatisticamente significativa entre as diferentes fases de leitura do IP, e não há interação entre os dois critérios avaliados.

Quadro 4 - Teste de Tukey para comparação entre as fases de leitura.

FASE	\bar{x}
T0	1,443 ^A
15 dias	0,715 ^B
30 dias	0,679 ^B
3 meses	0,678 ^B
6 meses	0,672 ^B
1 ano	1,067 ^C

letras iguais não possuem diferença estatisticamente significativa entre si. ($p < 0,05$)

De acordo com os resultados, podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa entre a leitura T0 e as demais, apresentando-se esta maior que todas. As leituras subsequentes ao tratamento apresentaram-se menores com significância estatística, não havendo diferença entre as leituras aos 15 dias, 30 dias, 3 meses e 6 meses, porém a leitura de 1 ano demonstrou-se estatisticamente maior que as anteriores, mas sem voltar aos níveis observados ao T0.

5.1.3 Profundidade de sondagem

Tabela 4 – Profundidade de sondagem ($\bar{x} \pm dp$) para ambos os grupos ao longo do estudo

FASE	T0	15 dias	30 dias	3 meses	6 meses	1 ano
D	1,478 ±0,410	1,306 ±0,118	1,359 ±0,167	1,422 ±0,187	1,398 ±0,153	1,526 ±0,167
ND	1,237 ±0,139	1,248 ±0,191	1,304 ±0,199	1,342 ±0,202	1,278 ±0,192	1,393 ±0,201

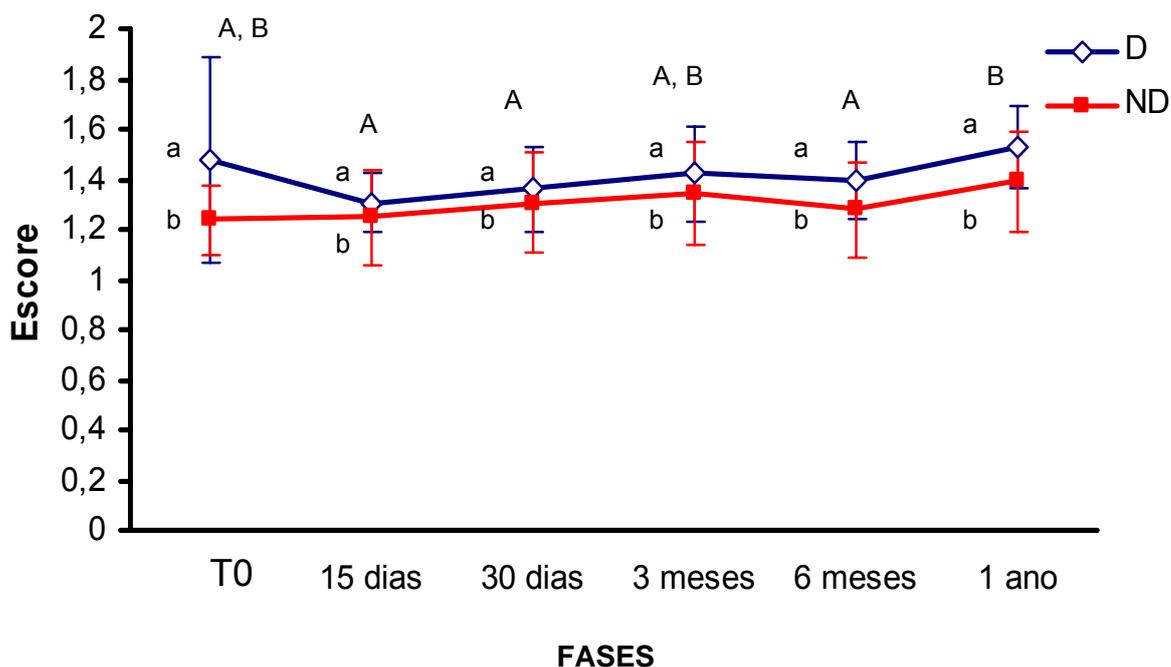


Figura 3 – Profundidade de sondagem em 1 ano de avaliação (em mm), para os grupos D e ND – letras maiúsculas iguais não possuem diferença estatisticamente significativa entre si (fases de leitura) e letras minúsculas iguais não possuem diferença estatisticamente significativa entre si (grupos)

Quadro 5 – ANOVA a 2 critérios (diferença entre grupos e fases)

ANOVA	Valor de p
Grupos	0,027*
Fases	0,001*
Interação	0,217

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

De acordo com o teste ANOVA houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e as diferentes fases de leitura da PS, porém não há estatisticamente interação entre os dois critérios avaliados.

Quadro 6 - Teste de Tukey para comparação entre as fases de leitura.

FASE	\bar{x}
T0	1,358 ^{A, B}
15 dias	1,277 ^A
30 dias	1,332 ^A
3 meses	1,382 ^{A, B}
6 meses	1,338 ^A
1 ano	1,459 ^B

letras iguais não possuem diferença estatisticamente significativa entre si. ($p < 0,05$)

Observando a Análise de Tukey verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa, para a profundidade de sondagem, entre o início e o fim do estudo. Embora para a última leitura (1 ano) seja encontrada diferença estatisticamente significativa entre as leituras intermediárias (15 dias, 30 dias e 3 meses), não há melhora no quadro entre o início e o fim do estudo, sugerindo que não houve modificação para este parâmetro estudado após a aplicação da terapia proposta.

Quadro 7 - Teste de Tukey para comparação entre os grupos.

Grupo	\bar{x}
Diabéticos	1,415 ^a
Não diabéticos	1,300 ^b

letras iguais não possuem diferença estatisticamente significativa entre si. ($p < 0,05$)

De acordo com os resultados, podemos observar que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, prevalecendo a maior média para o grupo diabéticos, em relação à profundidade de sondagem.

5.2 Resultados microbiológicos

Os resultados microbiológicos apresentados após a realização da Real-Time PCR evidenciaram baixa ocorrência de indivíduos positivos para *A. actinomycetemcomitans*, cerca de 18,75% (6 crianças). Deste total 6,25% estavam presentes no grupo diabéticos (2 crianças) e 12,50% no grupo não diabéticos (4 crianças).

Devemos ressaltar que a técnica é extremamente sensível, capaz de detectar microrganismos em quantidades muito pequenas, como neste trabalho onde detectamos de 1 a $1 \times 10^{(7)}$ UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 5 ng de DNA bacteriano (lembramos que a curva padrão foi delineada para a detecção de $1 \times 10^{(-2)}$ a $1 \times 10^{(7)}$ UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 5 ng de DNA). Para validar as reações, utilizamos como controle positivo primer para a porção 16S r-RNA e todas as 32 amostras de saliva acusaram a presença desta porção de DNA bacteriano. Como controle negativo utilizou-se água, não acusando qualquer contaminação.

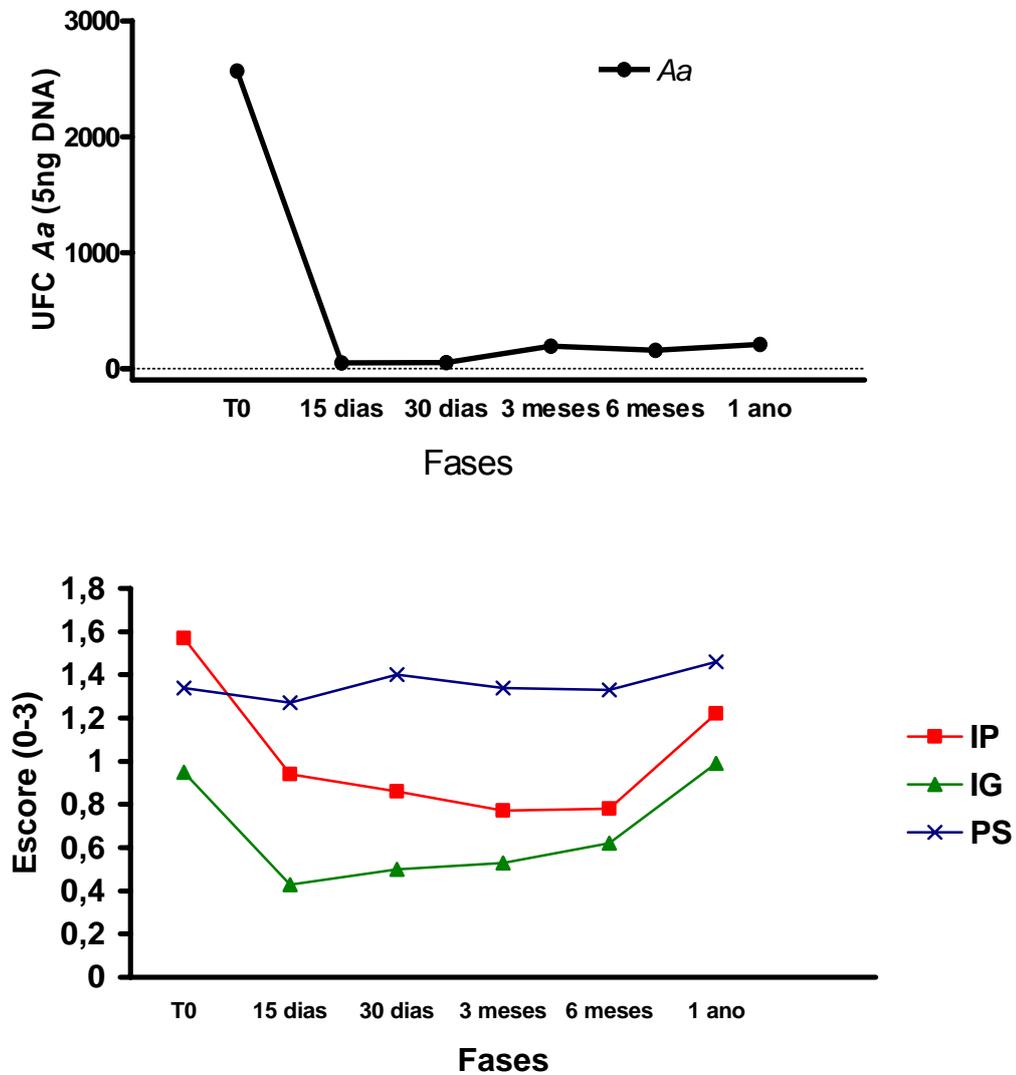
A pequena porcentagem de indivíduos positivos para a bactéria estudada exigiu uma análise descritiva dos dados obtidos. Os resultados estão reportados a seguir.

Tabela 5 – indivíduos positivos *A. actinomycetemcomitans* ($\bar{x} \pm dp$) – número de UFC em 5 ng de DNA bacteriano

FASE	T0	15 dias	30 dias	3 meses	6 meses	1 ano
AMOSTRA						
3 – D	7450 ±304,13	125,66 ±6,02	154,33 ±11,59	579 ±13,89	319,66 ±10,59	435 ±5,56
39 – D	767 ±15,39	48,66 ±4,16	30,66 ±2,08	34 ±1,73	50,33 ±3,05	144,66 ±5,03
13 – ND	206,33 ±17,21	75 ±4,58	56,66 ±4,16	--	129,66 ±10,01	166 ±22,60
19 – ND	11 ±2,82	--	--	--	--	--
27 – ND	36,33 ±10,01	--	--	20,66 ±3,05	71,33 ±17,09	40 ±3
35 – ND	76066,67 ±1792,57	356,33 ±34,64	216,66 ±11,71	317,66 ±50,34	1920 ±927,73	561 ±113,45
Média dos indivíduos positivos para <i>Aa</i>	2566,63 ±2793,74	48,76 ±49,50	50,04 ±58,84	193,00 ±220,05	156,98 ±107,70	209,56 ±146,91

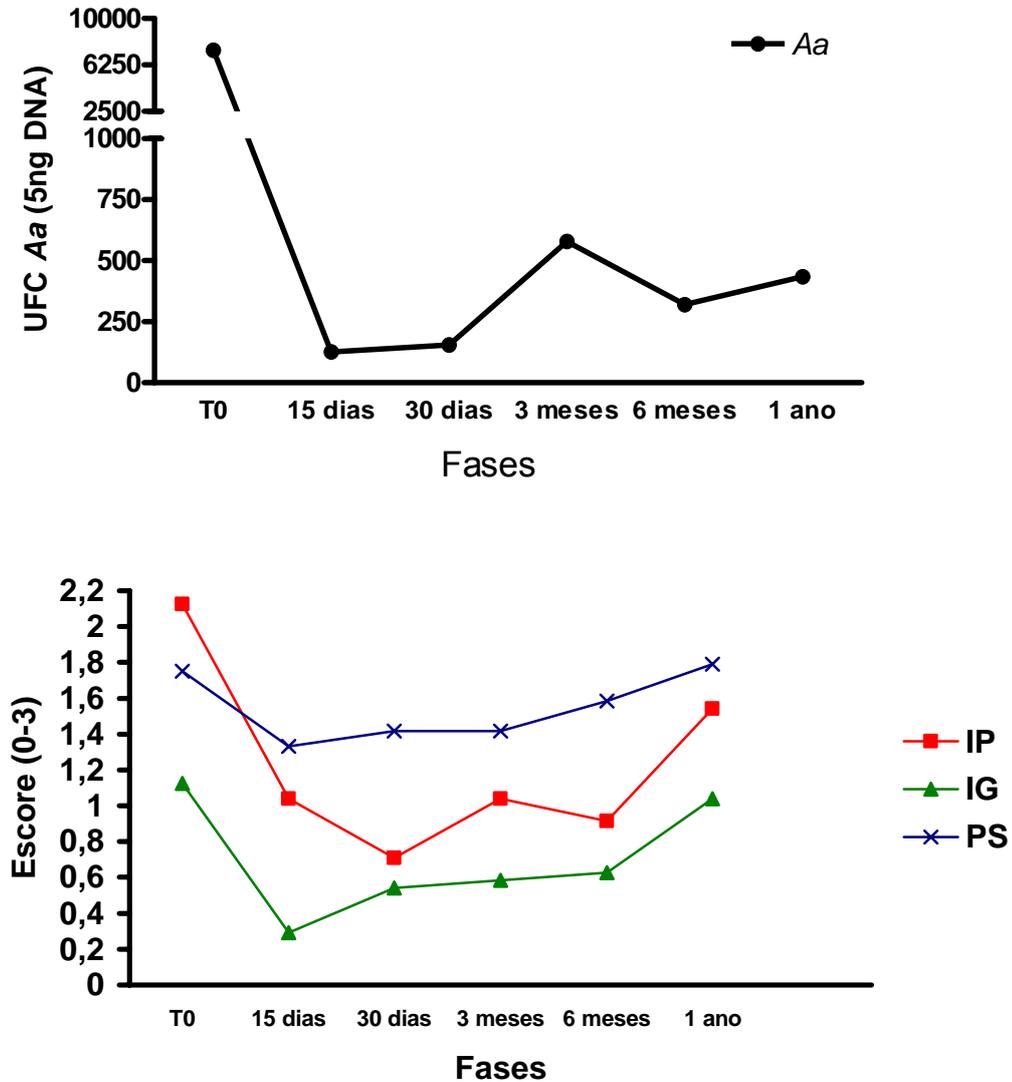
D = grupo diabéticos; ND = grupo não diabéticos; -- = não detectado

Figura 4 – Painel superior: número de UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (média dos indivíduos positivos para Aa)



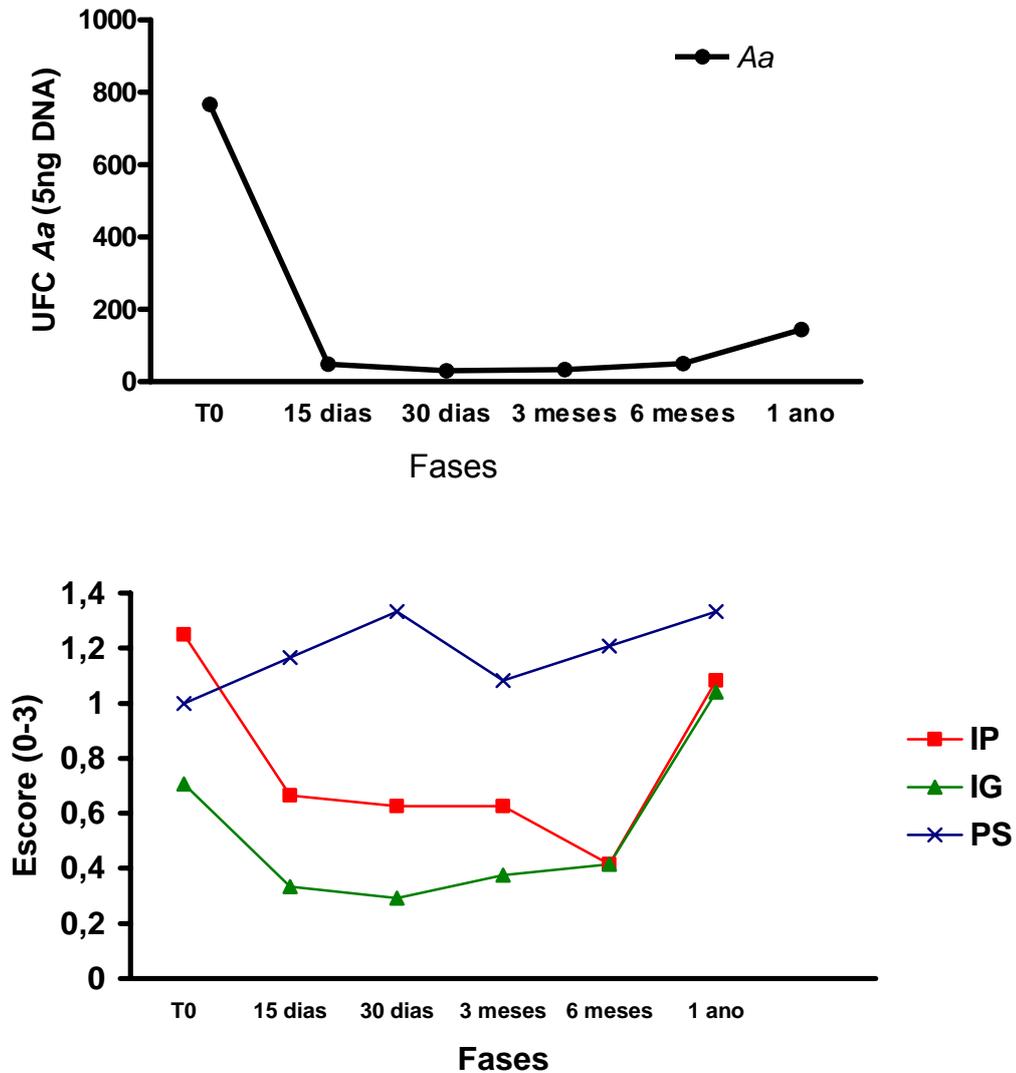
Quando se observou a média dos indivíduos positivos para a presença do *A. actinomycetemcomitans*, encontrou-se diminuição de grande porte em seu número. Demonstrou-se, após a utilização do gel de metronidazol 25%, queda considerável nos níveis do Aa, mantida até 30 dias e, mesmo com pequena elevação após este período, os valores permaneceram muito baixos até 1 ano. A mesma redução foi observada para os índices IP e IG, diminuindo após o uso do gel e elevando-se, de forma sutil e gradual, ao longo de 1 ano de acompanhamento. Os valores encontrados para PS, evidenciaram que não houve alteração neste parâmetro clínico durante o estudo.

Figura 5 – Painel superior: número de UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 3 do grupo diabético)



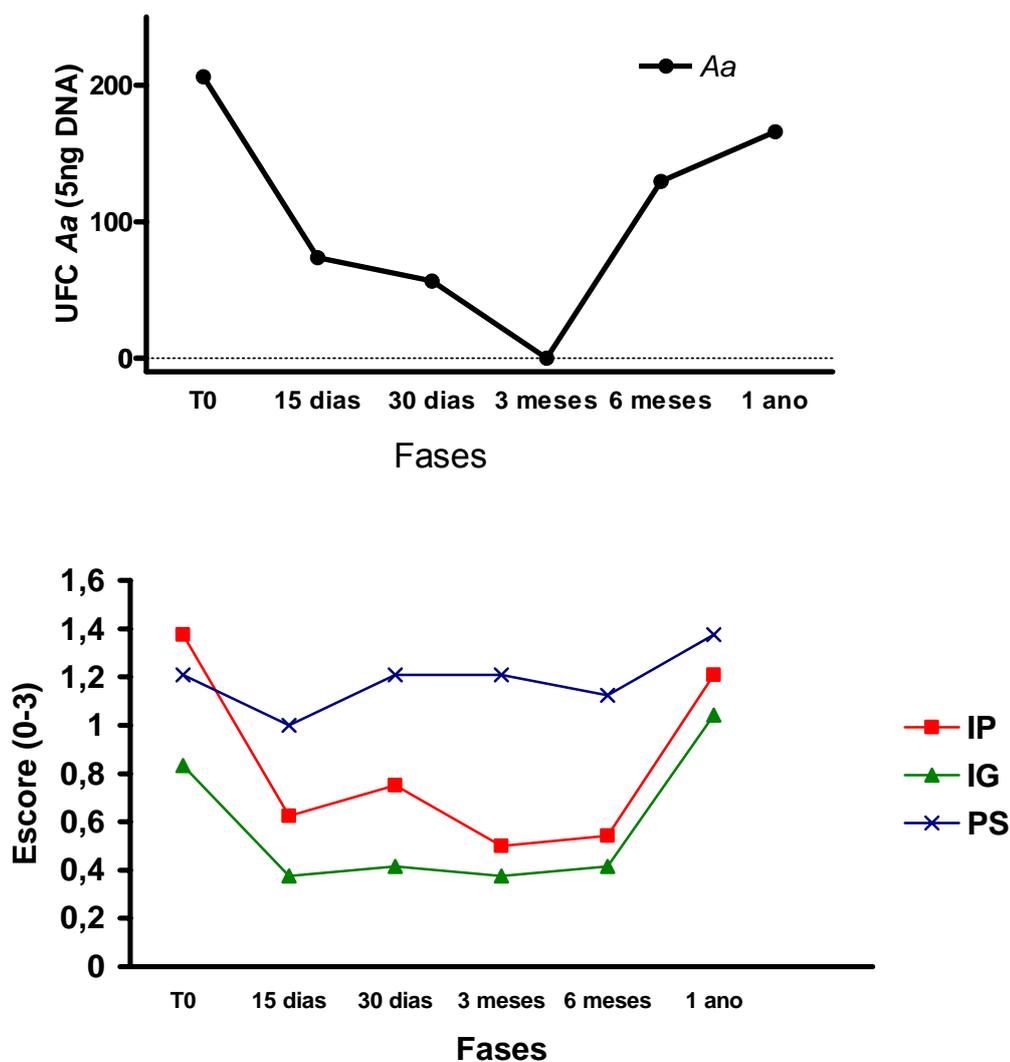
Os resultados do paciente 3 do grupo diabético apontados na figura 5 demonstraram que houve queda drástica no número de bactérias após a utilização do gel de metronidazol, mantendo-se em níveis muito baixos até por volta de 3 meses quando houve nova elevação sem, no entanto, voltar aos índices iniciais, permanecendo em patamares muito baixos. Os índices clínicos acompanharam esta queda voltando a valores próximos, mas ainda inferiores aos do início do estudo, após 1 ano.

Figura 6 – Painel superior: número de UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 39 do grupo diabético)



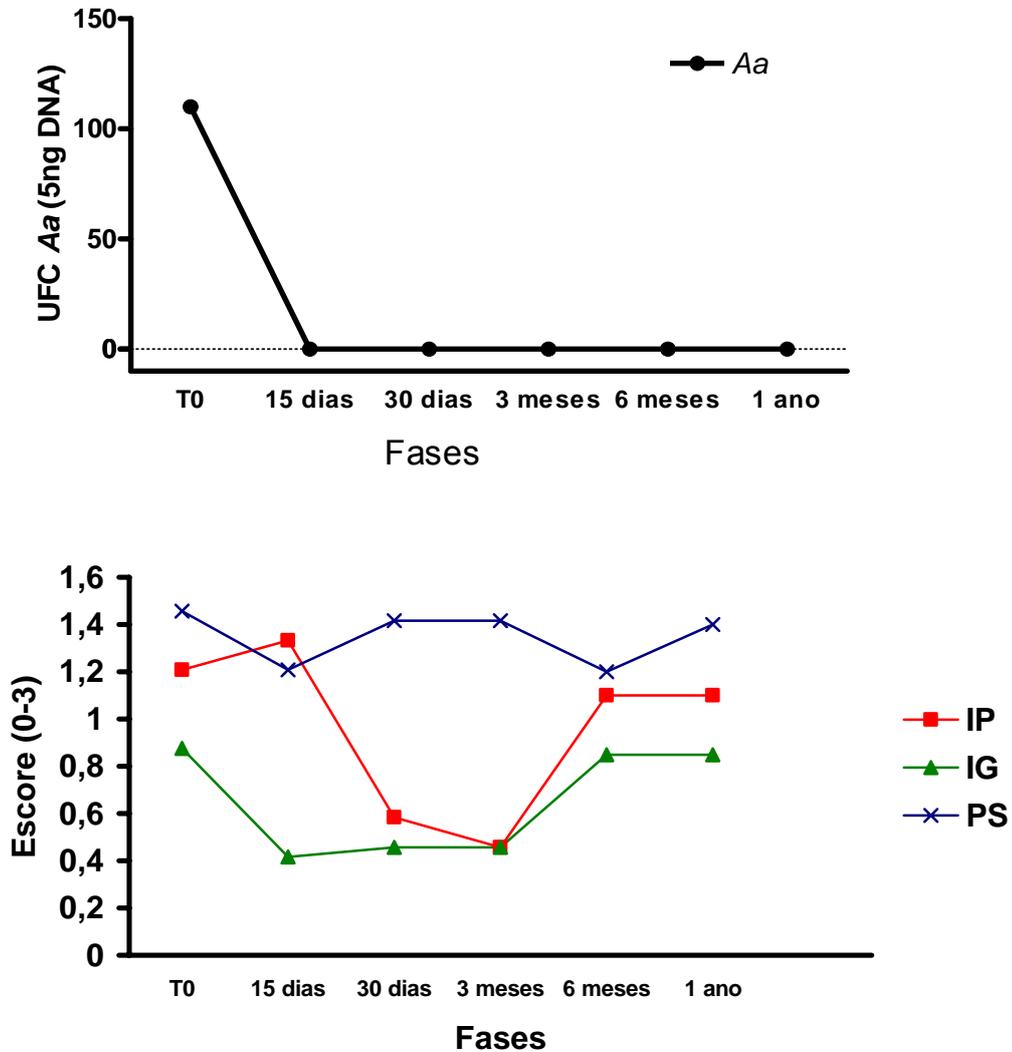
O paciente 39 do grupo diabético apresentou grande diminuição do número de bactérias após o uso do medicamento, chegando próximo ao limite de detecção, com sutil elevação após 6 meses. No entanto, ao final do estudo os valores ainda permaneceram muito baixos. Para os parâmetros clínicos, IP e IG, a queda demonstrada acompanhou a contagem da bactéria, com rápida elevação após 6 meses, atingindo os valores encontrados no T0 após 1 ano de acompanhamento.

Figura 7 – Painel superior: número de UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 13 do grupo não diabético)



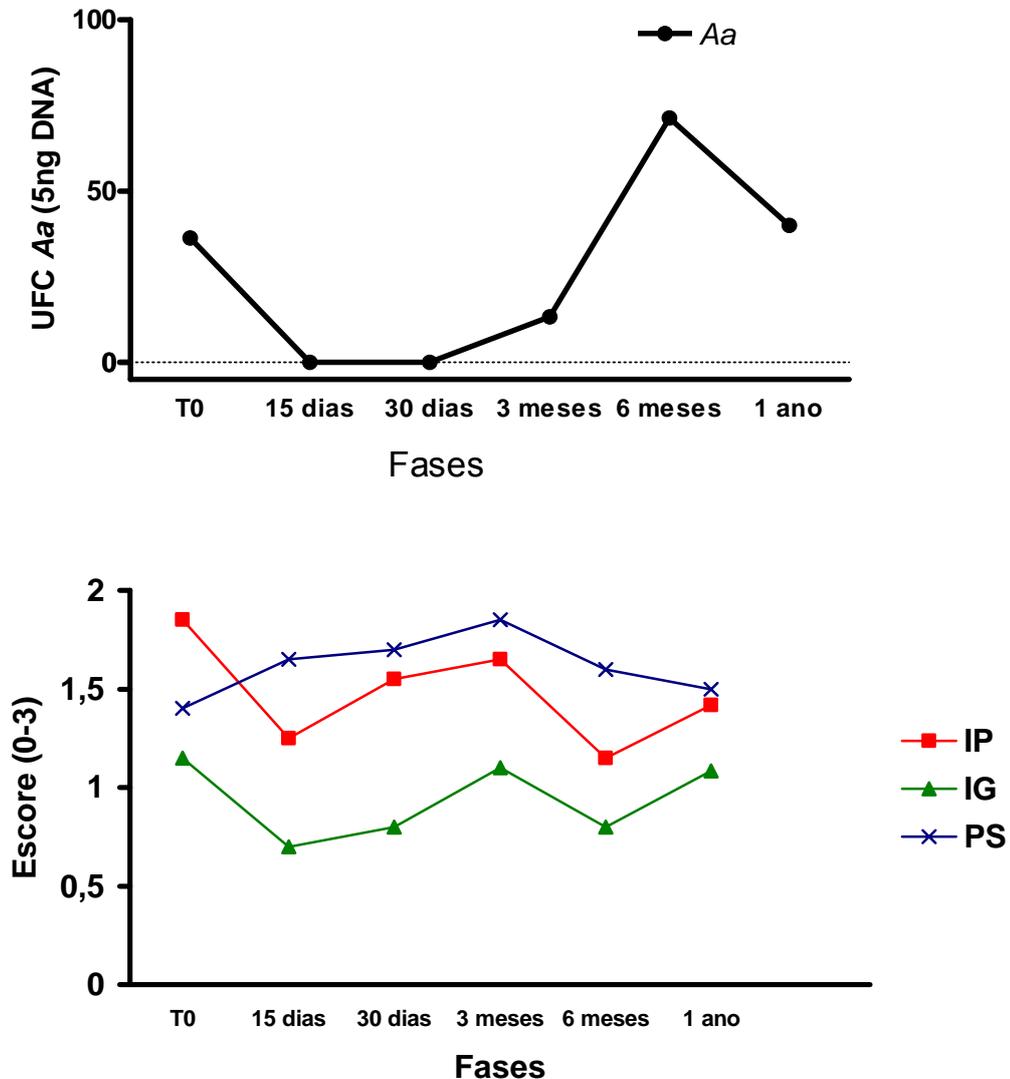
Os resultados obtidos para o paciente 13 do grupo não diabético apontaram uma sensível queda após a utilização do gel, reduzindo o Aa a níveis indetectáveis no intervalo de 3 meses, demonstrando elevação gradual após este período até 1 ano de acompanhamento, quando chegou-se próximo dos valores do início, porém, ligeiramente inferiores. Os índices clínicos demonstraram comportamento semelhante em relação ao IP e IG, menos para PS.

Figura 8 – Painel superior: número de UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 19 do grupo não diabético)



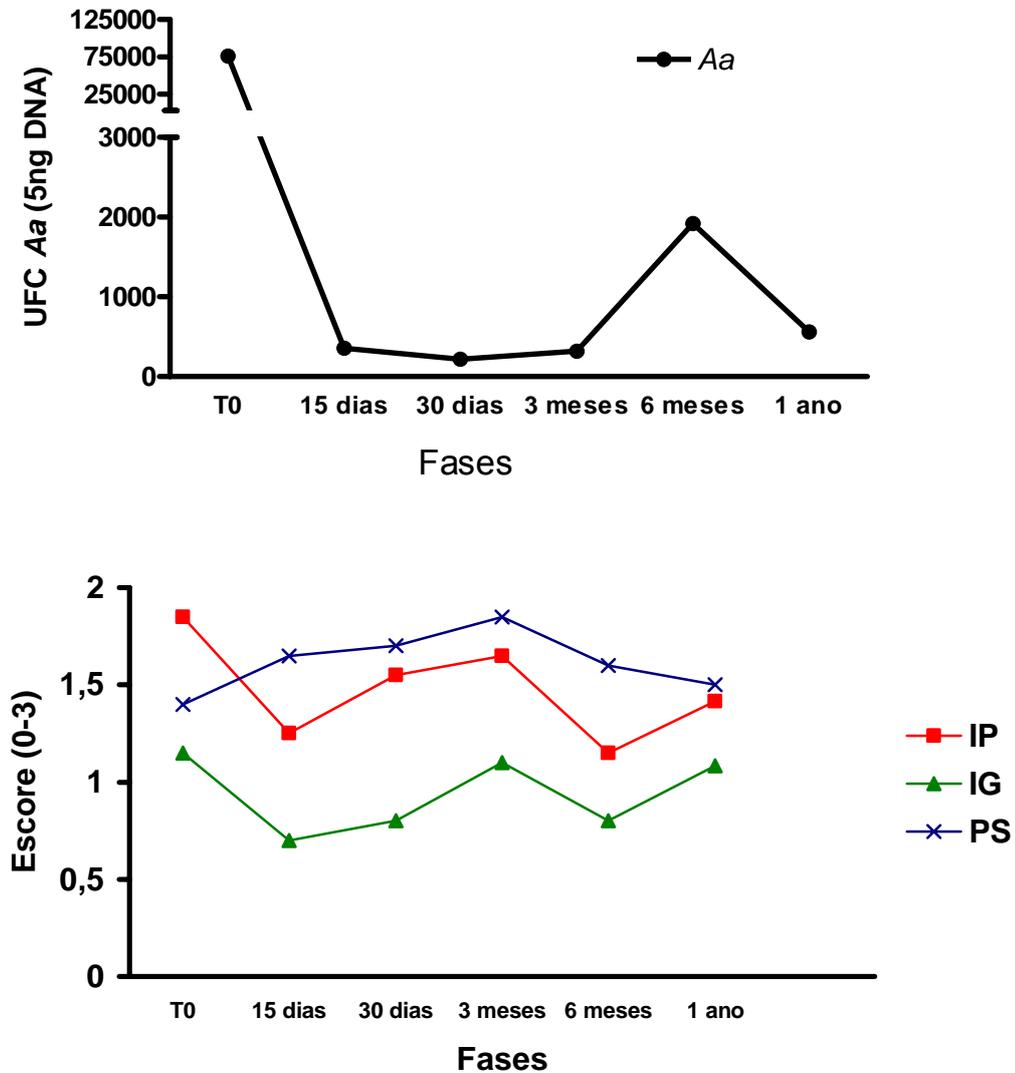
O paciente 19 do grupo não diabético, inicialmente com baixos níveis de *Aa*, demonstrou diminuição a níveis indetectáveis desta bactéria após a utilização do gel de metronidazol, que permaneceu por todo o estudo. Os índices clínicos (IP e IG) também apresentaram queda após o uso da droga até a leitura de 3 meses, quando novamente demonstraram elevação, ficando ao final de 1 ano próximos dos índices no T0. A PS, embora apresentando sensível queda após o uso do metronidazol, apresentou elevação logo em seguida e terminou o estudo praticamente ao mesmo nível inicial.

Figura 9 – Painel superior: número de UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 27 do grupo não diabético)



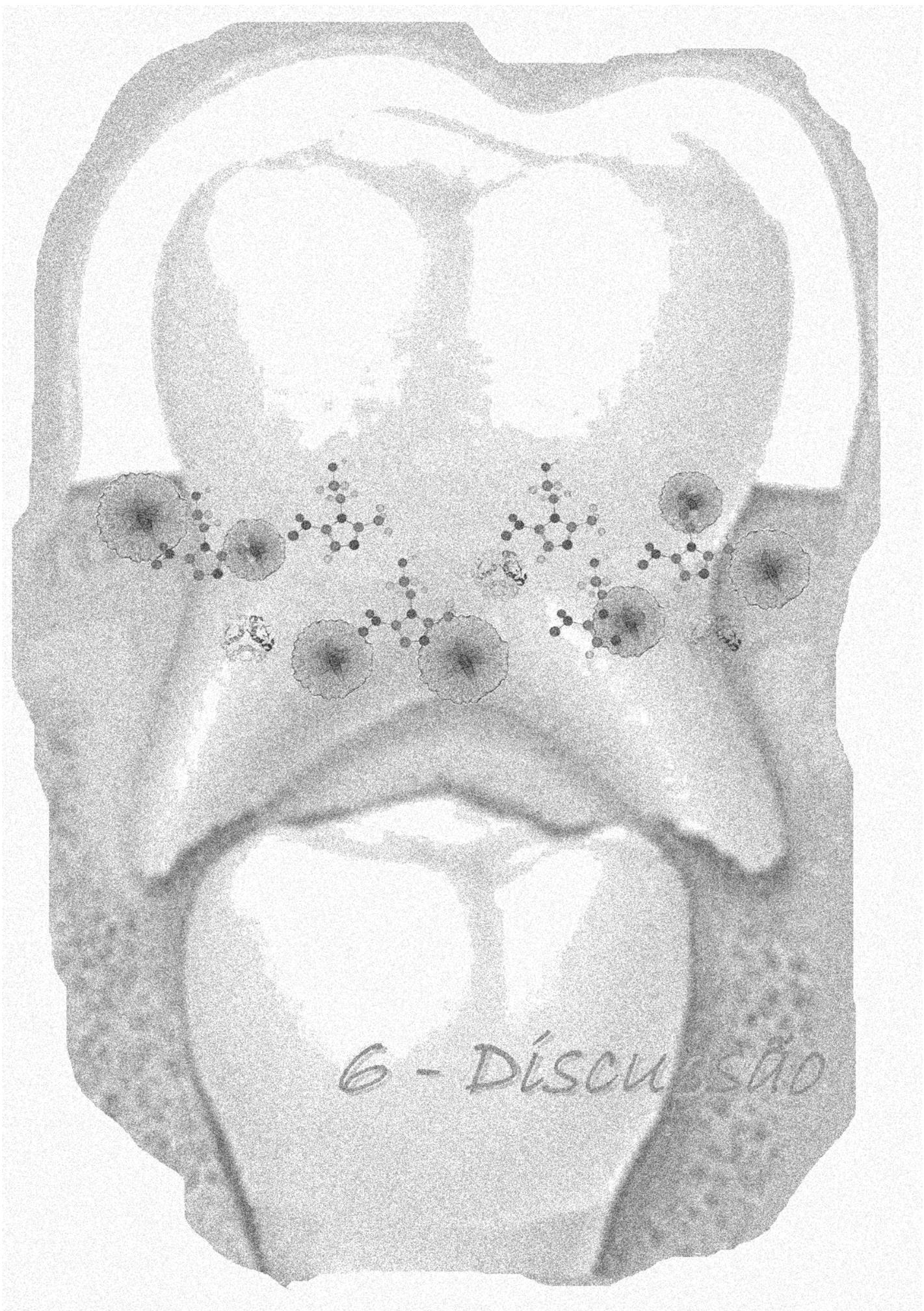
Para o paciente 27 do grupo não diabético houve queda no número de bactérias após o uso do gel, chegando a níveis não detectáveis, porém houve elevação deste índice após 30 dias do uso do gel, ultrapassando os valores obtidos para o T0 na leitura de 6 meses. Ao final de 1 ano, os valores estavam equiparados aos encontrados no início do estudo. Sem considerar a PS, que se elevou no decorrer do estudo, os índices clínicos (IP e IG) acompanharam a queda seguida de elevação demonstrada para as bactérias.

Figura 10 – Painel superior: número de UFC de *A. actinomycetemcomitans* em 5 ng de DNA bacteriano. Painel inferior: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. (paciente 35 do grupo não diabético)

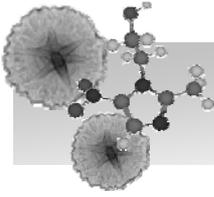


A redução demonstrada para o paciente 35 do grupo não diabético, após o uso do gel, foi bastante significativa, como demonstrado pela figura 10, mesmo com uma pequena elevação entre 3 e 6 meses, ao final do estudo foram observados em níveis extremamente baixos, quando comparado ao T0. Para IP e IG, observou-se uma queda considerável após o uso do gel, a qual foi mantida até 3 meses quando foram detectados sinais de elevação sem, no entanto, atingir os valores apresentados no início do estudo.

Assim, após a análise descritiva dos resultados que quantificaram a contagem do *A. actinomycetemcomitans*, nos indivíduos positivos para sua presença, foi possível verificar a ação do gel de metronidazol 25% avaliado pelo estudo, bem com sua efetividade.



6 - DISCUSSÃO



6 - DISCUSSÃO

A diabetes mellitus ou ainda diabete melito¹⁹ é uma doença metabólica caracterizada pela diminuição ou cessão total da produção de insulina pelas células das ilhotas pancreáticas, ou de Langerhans, as quais contêm ribossomos que abrigam os grânulos responsáveis pela síntese dos hormônios pancreáticos.

Ainda que possamos ter outros tipos de diabetes, como a insípido, a gestacional ou diabetes em decorrência de tumores pancreáticos ou devido à síndrome de Cushing, esta forma (mellitus) é a mais comum. Apresenta como sinais característicos a poliúria, a polidipsia e a polifagia, muito embora a diabetes do tipo I (IDDM), geralmente não precedida pela obesidade, possa relacionar a anorexia e o quadro de cetoacidose, o qual pode induzir ao coma e à morte. O paciente diabético pode demonstrar predisposição para infecções, dificuldade de cicatrização, fadiga, fraqueza e sudorese, alterações vasculares, retinopatia, doença renal e complicações neurológicas, dentre outros. Na cavidade bucal, encontramos a queilose, diminuição do fluxo salivar, alteração da microbiota e a doença periodontal destrutiva, como algumas alterações mais comuns.

Há uma predisposição hereditária e desencadeante de um distúrbio nestas células pancreáticas prejudicando, irreversivelmente, a secreção e a excreção da insulina. De perfil crônico, a presença de anticorpos das células das ilhotas no indivíduo recém-diagnosticado sugere um mecanismo auto-imune na destruição das células beta produtoras de insulina^{2, 50, 52, 54, 55} que, acredita-se estar associado a genes ligados aos antígenos leucocitários humanos (HLA)-DR3/4¹⁰². A diabetes tipo I é ainda mais agressiva e de estabilização crítica, com regulação do sistema imune anormal², acarretando ao paciente mais limitações e seqüelas do que a do tipo II e guardando uma relação muito estreita com o seu controle metabólico pelo paciente³⁶.

Embora seja sugerido o envolvimento de diversos mecanismos em sua patogênese⁶², o desenvolvimento da diabetes tipo I parece ser resultante de injúrias viróticas ou tóxicas às ilhotas do pâncreas em uma criança geneticamente predisposta a desenvolver a desordem^{2, 112}. Pode estar relacionada ainda a alguns fatores ambientais^{50, 62} como, por exemplo, desde a obesidade^{45, 54, 55} e até mesmo com a exposição precoce às proteínas do leite bovino^{2, 50}. Temos ainda o aumento da demanda de insulina provocado pelo crescimento rápido ou a resistência à insulina causada pelo stress, infecções, adolescência, etc., levando as células beta à exaustão e, na presença de antígenos, podem causar, ambos, uma reação auto-imune em indivíduos geneticamente predispostos⁶².

Não obstante os sintomas de diabetes possam desenvolver-se de repente, a injúria inicial pode levar meses ou anos para manifestar-se clinicamente¹¹². Também é conhecida como diabetes juvenil ou diabetes de início juvenil, embora possa ocorrer em idades mais avançadas. É marcada pela falta absoluta de insulina, muito instável, de difícil controle, com tendência para cetose e coma, e apresenta sintomas tradicionalmente associados como polifagia, polidipsia, poliúria, predisposição a infecções e anorexia¹¹². Observa-se em pacientes diabéticos uma resposta inflamatória exagerada, em grau de inflamação e carga bacteriana¹⁰².

A insuficiência da insulina é capaz de favorecer a entrada de glicose nas células e, com isso, a quantidade de açúcar no sangue aumenta. Neste quadro há a ocorrência de uma oxidação insuficiente, onde as células iniciam um consumo das substâncias de reserva (gordura, proteínas, etc.) fazendo-as retroceder à corrente sangüínea. Isso significa aumento da viscosidade sangüínea. Em adição, esta decomposição protéica, pode levar à fraqueza muscular e à queda de resistência orgânica, desenvolvendo paralelamente um quadro de hipovitaminose B e C²⁵.

Mudanças nos níveis hormonais, presumivelmente, podem afetar o tecido gengival, por exemplo, aumentando a permeabilidade capilar. Entretanto, estas podem, direta ou indiretamente, mudar a composição da microbiota subgengival fornecendo nutrientes essenciais a alguns de seus membros e, como conseqüência, temos a doença periodontal severa frequentemente coexistindo com uma diabetes severa. Dessa forma, gengivite

e periodontite mais severas são encontradas em indivíduos diabéticos tipo I, entre 11 e 18 anos, com mais freqüência do que em controles da mesma idade, e com maior perda óssea³⁶.

A incidência de perda óssea alveolar avançada na dentição decídua é incomum, contudo, relata-se que a destruição óssea na dentição decídua, na ausência de fatores locais, é altamente sugestiva de doença sistêmica, dentre outras: hipofosfatasia, Síndrome de Papillon-Lefèvre, neutropenias, **diabete melito** e esclerodermia⁶⁸. Em situações normais, a gengivite poucas vezes progride à periodontite no pré-escolar, e a perda óssea é rara. Todavia, a perda de inserção com colapso do osso alveolar, exposição das superfícies radiculares, mobilidade e perdas dentárias podem ser registradas em casos de doenças sistêmicas como a diabetes^{32, 112}, assim como o maior sangramento gengival e profundidade de sondagem também são característicos dos indivíduos diabéticos³².

Devido à queda de resistência orgânica, verifica-se capacidade quimiotática e fagocitária diminuída dos glóbulos brancos em pessoas portadoras de diabetes, principalmente aquelas descompensadas; ao mesmo tempo, qualquer contaminação é mais intensa no diabético em função desta baixa resistência do organismo^{25, 36}.

Na diabetes mellitus aumenta-se o risco de desenvolver doença periodontal de forma que não pode ser explicada com base em idade, sexo ou acúmulo de placa dentária. Apenas se sabe que as infecções de origem periodontal são crônicas, geralmente causadas por Gram-negativos, não somente afetam os tecidos que envolvem o dente, mas também constituem um desafio sistêmico às células imunocompetentes e às células ativas na cascata inflamatória³³. Ainda, como conseqüência da hiperglicemia, a glicosilação e oxidação que ocorrem nestes indivíduos, resultam na formação de produtos patogênicos que levam à inflamação crônica e induzem a reabsorção óssea, com destruição de tecido por meio de citocinas inflamatórias^{32, 76}.

Em adição, da mesma maneira que o metabolismo alterado da glicose pode ser responsável pelo aumento da severidade da gengivite, também sugere-se que o sangramento gengival pode ser usado como um “parâmetro caseiro” para o monitoramento do controle metabólico da doença, observando-se uma proposta de duas vias para a relação entre diabetes

mellitus e a doença periodontal/infecção³⁶. GROSSI; GENCO³³, 1998, apresentaram um modelo segundo o qual a doença periodontal severa aumenta a severidade da diabetes e complica seu controle metabólico.

O conceito de um perfil hiperinflamatório em indivíduos susceptíveis à periodontite, onde uma elevada secreção monocítica de PGE₂, IL-1beta, TNF-alfa, em resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, era percebida quando comparada com controles periodontite-resistentes, foi descrito similarmente para indivíduos IDDM. Sugeriu-se assim que, pacientes diabéticos que possuem este perfil monocítico alterado, podem ser considerados como de alto risco quando expostos à infecções por gram-negativos, como nas doenças periodontais¹⁰².

A alteração do metabolismo da glicose, que resulta em hiperglicemia e hiperlipidemia, aumenta a susceptibilidade e agressividade das doenças periodontais com a formação de produtos finais da glicosilação (AGEs). A interação entre estes produtos e os seus receptores presentes nas células humanas favorece a geração de um meio pró-inflamatório, onde os periodontopatógenos gram-negativos atuam, pois possuem em sua parede bacteriana os LPS, os quais estimulam a liberação dos mediadores inflamatórios citados (TNF-alfa, IL-1 e PGE₂) que, por sua vez, incitam a produção de mediadores secundários. Estes mediadores secundários amplificam e sustentam a resposta inflamatória e, nos diabéticos tipo I com resposta inflamatória exacerbada, farão com que a destruição de tecido ósseo e conjuntivo contribua para aumentar ainda mais a susceptibilidade às infecções, transformando-se em um ciclo vicioso¹⁰⁹. Na verdade, os mecanismos envolvidos na diabetes relacionados à patogênese da doença periodontal são de fato muito complexos e, ao que parece, ainda não se definiu ou não se conhece exatamente o que compromete o controle da infecção, mesmo com altos níveis de mediadores inflamatórios.

Organismos periodontopatogênicos exibem um número de fatores de virulência que os permitem escapar da ação dos neutrófilos e se estabelecer na região subgingival de forma crônica. Entre estes fatores, os mais relevantes são os lipopolissacarídeos bacterianos (LPS endotoxina), ácidos lipoteicóicos, toxinas, proteinases, ácidos graxos de pequenas cadeias, e produtos da cápsula e membrana celulares. Uma vez que o desafio bacteriano esquivou-se

do sistema de eliminação do hospedeiro, primeiramente providenciado pelos neutrófilos polimorfonucleares, este hospedeiro torna-se exposto a uma ordem de produtos e toxinas bacterianas. A interação de alguns destes produtos bacterianos com células fagocíticas mononucleares resulta na ativação da cascata catabólica inflamatória, com a síntese e secreção de mediadores incluindo PGE₂, IL-1 β , TNF- α , e IL-6. Em adição a isto, um ciclo catabólico de expressão de citocinas é estabelecido com inflamação, expressão de metaloproteinasas da matriz, destruição de tecido de suporte e reabsorção do osso alveolar³³. Por fim temos ainda a expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) aumentado em tecidos gengivais de pacientes diabéticos, em especial nos que apresentam doença periodontal¹²⁵.

O *A. actinomycetemcomitans* é capaz de evitar mecanismos importantes de defesa do hospedeiro pela sua habilidade de resistir à lise mediada pelo complemento, por alterar linfócitos, por produzir um fator de inibição da quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, e por elaborar uma potente leucotoxina³⁸. Assim, uma simultânea produção de epiteliotoxina, colagenase, fator de inibição de fibroblasto, toxina indutora de reabsorção óssea e endotoxina lipopolissacarídea pode permitir ao *A. actinomycetemcomitans* invadir o tecido gengival de suporte e destruir os tecidos periodontais. Ainda, a infecção inicial de *A. actinomycetemcomitans* estimula a produção de anticorpos opsonizadores (susceptíveis à destruição) contra antígenos de superfície que permitem a bactéria seja morta por células fagocíticas, e a neutralização de leucotoxinas pelos anticorpos¹²⁸.

Mecanismos imunológicos esforçam-se para controlar o *A. actinomycetemcomitans* no local da infecção, mas eliminam um número insuficiente destas bactérias que podem se disseminar para outros sítios periodontais. Dessa forma, o estabelecimento de uma resposta imune adequada ao *A. actinomycetemcomitans* tem um papel mais importante na limitação do processo da doença. Assim, a doença periodontal, agora vista como resultante de uma complexa relação entre infecção bacteriana e resposta do hospedeiro modificada por diversos fatores²¹, está associada não somente às condições sistêmicas, em nosso caso a diabetes mellitus tipo I, mas também às alterações deste sistema imune, as quais são capazes de afetar o periodonto e/ou o tratamento da doença.

Estudos em crianças portadoras de diabetes do tipo I podem auxiliar no entendimento de como a infecção precoce destas crianças, mais susceptíveis à doença periodontal por microrganismos periodontopatogênicos, possam contribuir para o aparecimento também mais cedo desta. A instalação prematura de bactérias anaeróbias, gram-negativas tais como o *A. actinomycetemcomitans*, tem sido demonstrada por vários trabalhos^{27, 47, 71, 83, 100, 110}, mas ao que parece sua expressão não é tão evidente, o que foi possível constatar com a execução deste trabalho.

Ao fazer-se a opção por trabalhar com crianças entre 3 e 12 anos de idade, portadoras de Diabetes mellitus tipo I, que estivessem em fase de dentição decídua ou mista, e que não tivessem feito uso de antibióticos nos 6 meses anteriores à realização do estudo, restringiu-se ainda mais o número de participantes da amostra a ser estudada. Lembrando que a própria incidência de casos de IDDM em Bauru não é muito elevada, estando em cerca de 7,6/100.000 habitantes entre 0 e 14 anos²². Além deste aspecto, ao longo deste estudo clínico longitudinal alguns participantes não puderam ser avaliados após 1 ano da fase experimental em função de algumas ocorrências, enfermidades adquiridas e/ou a necessidade da utilização de drogas antimicrobianas que poderiam alterar os resultados obtidos, dentre outros aspectos - utilização de antibióticos (9), abandono (4), mudança de endereço (2), internação (1), trauma de face (1) e óbito (1). Ressalta-se que todos os indivíduos pertencentes ao grupo D, que apresentavam a IDDM, estavam vinculados à Associação dos Diabéticos de Bauru e mantinham um controle metabólico da doença muito bom, fato este que pode ser considerado como positivo para a prevenção da doença periodontal, corroborado pelos índices clínicos avaliados (IP, IG e PS), muito próximos dos padrões de normalidade.

Em concordância com KIMURA et al.⁴⁷, 2002, são poucas as informações que estão disponíveis sobre a infecção bacteriana periodontal na infância, em particular relacionando esta à diabetes, uma vez que esta manifestação sistêmica tem sido sugerida como um fator de aumento da susceptibilidade à gengivite e periodontite na puberdade⁷⁰. Pouco se sabe a respeito da colonização e a resposta do hospedeiro, em relação ao *A. actinomycetemcomitans* em crianças⁷¹. Alguns dados sugerem inclusive uma correlação positiva para a presença de bactérias periodontais em crianças e

suas mães¹¹⁸ e, existem evidências de que logo aos 3 anos é possível identificarmos sua presença, a qual está associada ao início e severidade da gengivite⁷¹, muito embora a colonização de muitos periodontopatógenos possa ocorrer em idade precoce na infância sem a manifestação de sinais clínicos da doença periodontal⁴⁷.

Assim a opção por investigar a ocorrência do *A. actinomycetemcomitans* e uma forma de prevenir sua manifestação faz-se necessária, pois é sabido que a toxina do *A. actinomycetemcomitans* é reconhecidamente um importante fator de virulência na patogênese da periodontite localizada e outras formas de periodontite de início precoce³⁸.

A identificação do *A. actinomycetemcomitans* pode transformar-se em uma ferramenta valiosa para auxiliar no diagnóstico, decisões de tratamento e terapia de diversas formas de doença periodontal, em especial a periodontite juvenil localizada^{18, 20}. Sua ocorrência vem ao longo dos estudos sendo demonstrada^{18, 71, 110, 118}, sempre presente embora variando seus valores entre escores extremamente baixos (1,7 a 4,7%)¹⁰⁰ a valores acima de 50%²⁷, mesmo em indivíduos sem evidência de gengivite. Lembrando sempre que a placa é o fator mais importante relacionado à progressão da doença periodontal e, nesta, a presença do *A. actinomycetemcomitans* pode estar associado a um aumento desta progressão^{47, 121}. KIMURA et al.⁴⁷, 2002, sugere ainda que o número de espécies bacterianas na placa dentária pode aumentar gradualmente com a idade. Além disso, entre a relação entre a microbiota oral e a diabetes há uma sugestão de mudança significativa da primeira durante a puberdade⁷⁰. Mudanças na proporção e frequência das bactérias periodontopatogênicas são distintas nos diferentes estágios de maturação fisiológica, onde o *A. actinomycetemcomitans* apresenta-se mais constantemente em escolares e pré-adolescentes que apresentam gengivite e diretamente relacionado aos índices clínicos⁷³.

Este patógeno é encontrado mais comumente na periodontite juvenil localizada^{18, 20, 36, 128}, presente até cem vezes mais do que em lesões de gengivite²⁰. Fato este que, de certa forma, pode tentar explicar a baixa ocorrência deste periodontopatógeno em nosso estudo, uma vez que, comparando-se com os valores encontrados para os índices clínicos (IP, IG e PS), estes estavam em níveis aceitáveis.

Posto isto, se as doenças periodontais são infecções bacterianas, uma boa alternativa para o seu tratamento ou prevenção seria o uso de antimicrobianos, com o objetivo de eliminar ou manter em níveis não detectáveis os patógenos periodontais³⁰, como os demonstrados pelos resultados deste trabalho, nos pacientes onde havia detecção do *A. actinomycetemcomitans*.

CIANCO¹⁴, 1997, sugeriu o uso de antimicrobianos de ação tópica como uma ferramenta de grande poder, apresentando uma boa eficácia no controle da placa supragengival e, notadamente eficazes, no tratamento da periodontite juvenil dentre outras formas da doença.

A eliminação da infecção periodontal através do uso de antibióticos pode auxiliar no controle não somente do estado bucal, mas também melhora o controle da diabetes³³. Há muito se tem utilizado o metronidazol como agente terapêutico para o tratamento das diversas formas de periodontite^{1, 3, 5, 7, 26, 31, 34, 35, 39, 46, 48, 49, 51, 58, 59, 75, 82, 85, 93, 88, 95, 96, 103, 104, 114, 115, 116}, entre elas a periodontite juvenil, ocorrência muito comum em pacientes diabéticos^{14, 104, 127}. Este fármaco pode ser utilizado sozinho^{31, 34, 35, 57, 88, 91, 115, 116} ou como coadjuvante em associação à terapia invasiva^{1, 3, 7, 51, 58, 85, 94, 96, 114}. Há referência na literatura de que o uso de antimicrobianos e outros quimioterápicos pode representar um importante meio auxiliar em complemento à terapia mecânica, na tentativa de limitar a progressão das doenças dos tecidos gengivais¹⁴.

Também observamos o uso desta droga em conjunto com outros tipos de antibióticos^{87, 95, 104, 127}, porém sempre o uso do metronidazol está caracterizado de forma curativa^{26, 39, 103}, quando a doença já está instalada e, na maioria das vezes, com algum dano presente para o indivíduo.

STOLTZE¹¹⁶, 1992, observou que um gel de metronidazol 25%, quando aplicado diretamente em bolsas periodontais inflamadas, poderia estar presente em concentrações acima da MIC50 mesmo após 24 horas de sua aplicação, sugerindo ser um antimicrobiano efetivo contra *A. actinomycetemcomitans*. Poderíamos ter picos de concentração plasmática e biodisponibilidade média satisfatórios entre 2 a 8 horas da aplicação^{15, 115}. Ainda segundo PAVICIC et al.⁸⁷, 1994, parece ser a sua atividade nitrorredutase a responsável pela susceptibilidade do *A. actinomycetemcomitans* ao metronidazol.

Estando frente a uma doença assinalada por ter um componente microbiano, com uma condição sistêmica agravante e de início precoce, porque não o utilizarmos também de forma preventiva, diminuindo o risco da contaminação bacteriana começar a exercer seu papel como desencadeador da doença periodontal. Em associação a instituição de hábitos saudáveis de higiene bucal, dieta e controle mecânico de placa, o uso de uma droga antimicrobiana que atue sobre os patógenos periodontais, em analogia aos fluoretos presentes nos dentifrícios comumente utilizados inclusive para crianças, também poderia ser utilizado com o enfoque preventivo. Há tempos reconhece-se o valor dos bochechos de colutórios antimicrobianos de ação tópica para o controle da placa e, que o efeito destes medicamentos poderiam ser melhor aproveitados quando se utilizam dispositivos para irrigação¹⁴. Porque então não fazer uso deste agente através de uma formulação semelhante à de um dentifrício e, com a recomendação de seu uso especificamente para populações sabidamente de risco à doença periodontal, assim como os diabéticos, por exemplo.

Em doses seguras, sem a apresentação de efeitos colaterais, sob supervisão de um cirurgião-dentista, em lugar de utilizar a droga via sistêmica, o uso do metronidazol em substituição ao produto diário utilizado para escovação, poderia representar um veículo confiável quando utilizado em cremes ou géis dentais. Principalmente quando indicados para crianças de menos idade, visto que o seu uso tópico garantiria efetividade sem a ingestão sistêmica do medicamento como ocorre em sua formulação via oral ou injetável. E mesmo que, acidentalmente, o mínimo de gel seja deglutido, sugere-se que a carga sistêmica após a aplicação de gel dental de metronidazol 25% é ainda menor do que um comprimido de metronidazol 250 mg¹⁵, além do fato que, na dose recomendada, quase não há risco de efeitos colaterais em seres humanos, em particular com relação à indução de toxicidade aguda, mutagenicidade e câncer³¹. Devido às baixas concentrações plasmáticas que o metronidazol pode atingir após a sua aplicação local, o risco de efeitos secundários, superdosagem, intolerância ou resistência é mínimo, sendo eliminado essencialmente pela urina, inclusive com cerca de 15 a 20% de metronidazol sob forma inalterada¹⁵.

Embora não devamos recomendar esta terapia para uso constante como acontece com os fluoretos, pois mais pesquisas devem ainda ser feitas para avaliar-se as conseqüências do seu uso prolongado, o seu emprego deve ser encorajado nos momentos onde o profissional identificar maior necessidade. Em períodos onde o controle de placa não puder ser tão efetivo como, por exemplo, durante internações em função de complicações de saúde, por vezes oriundas da própria diabetes, quadro este muito presente nestes indivíduos. Mesmo se observássemos uma abordagem curativa, a utilização de um veículo mais acessível ao público infantil, como a escovação, seria também útil em especial para pacientes displicentes com o uso de medicação, visto que o fato de não ser observado pelo paciente a correta prescrição dos medicamentos, pode ser prejudicial ao sucesso do tratamento de infecções periodontais com agentes antimicrobianos administrados de forma sistêmica⁵⁷.

HANCOCK; NEWEL³⁷, 1994, reconhecendo o uso de substâncias antimicrobianas no controle eficaz de microrganismos que desempenham importante papel na etiologia da doença periodontal, recomendam seu uso nos mais variados veículos de aplicação que incluem enxaguatórios bucais, dentifrícios, além da aplicação tópica e administração sistêmica. No entanto, o uso de soluções de irrigação também parecem não ter um desempenho muito satisfatório em tratamento periodontais de maior duração⁶⁴, e para o uso do metronidazol na forma gel (Elyzol 25% Dental Gel) encontraram-se resultados semelhantes para aspectos clínicos quando comparado com o uso de metronidazol sistêmico (Flagyl)⁸².

A utilização também se justificaria em ocasiões onde o controle da alteração sistêmica não estivesse tão eficaz; em situações pré e/ou pós-operatórias onde fosse interessante diminuir a manifestação de bactérias anaeróbias gram-negativas, visto que muitas vezes, o simples uso do metronidazol poderá reduzir a necessidade cirúrgica do paciente⁵⁸; ou quando o profissional identificasse o aumento de fatores de risco, placa dentária ou mesmo frente à presença de uma gengivite um pouco mais significativa. Mesmo porque, muitas vezes a doença periodontal inicia-se como uma gengivite suave, sem sangramento ou recessão gengival, e pode transformar-se em periodontite severa, especialmente em crianças com controle ruim da diabetes⁴¹. Ao mesmo tempo, comprovadamente, o controle ruim da glicose

sangüínea leva a um maior sangramento gengival e a prevenção da inflamação gengival iniciada pela placa dentária deverá ser enfatizada nestes pacientes⁴⁴.

Uma correlação positiva entre a duração da diabetes e a perda de inserção clínica é encontrada por FIRATLI; YILMAZ; ONAN²³, 1996, porém esta mesma relação não foi observada para profundidade de bolsa, índice de placa e índice gengival. Este achado vem em concordância com nossos resultados clínicos, onde os valores dos parâmetros estudados (IP, IG e PS) estavam bem próximos da normalidade, ressaltando que a idade trabalhada variou entre 3 e 12 anos (média de 8,03 anos) e, dessa forma, com o tempo de diagnóstico da diabetes não tão longo. Outra vez lembramos que todas as crianças tinham um controle metabólico da alteração sistêmica bem satisfatório, o que de acordo com o estudo de PINDUCCIU et al.⁹², 1996, pacientes portadores de IDDM compensados do ponto de vista metabólico, tendem a demonstrar uma prevalência de alterações periodontais apenas discretamente maior em relação à pacientes saudáveis. Tal fato pode ser observado em nossos pacientes onde, embora todos os índices clínicos se apresentassem ligeiramente mais elevados no grupo D, apenas a PS apresentou-se com diferença estatisticamente significativa entre os grupos D e ND, mesmo assim, ainda em valores admissíveis.

Por outro lado, o uso do gel de metronidazol 25% formulado pelo estudo, bem aceito em seu sabor e consistência (embora o fabricante do Elyzol 25% Dental Gel relate a possibilidade da ocorrência de gosto amargo e ardência local temporária¹⁵ – que não foram observados nos indivíduos participantes), demonstrou elevada redução dos níveis de UFC de *A. actinomycetemcomitans*, considerada imediatamente após sua utilização, permanecendo esta redução entre 1 e 3 meses e, na maioria dos casos, mantendo os níveis bacterianos bem abaixo dos valores iniciais até o final do estudo, de maneira semelhante a que se observa quando utilizado metronidazol via oral¹⁰⁴. Esta diminuição pareceu produzir bons resultados clínicos para IP e IG. Resultados semelhantes também foram encontrados por PAVICIC et al.⁸⁷, 1994, quando estes associaram metronidazol+amoxicilina ao debridamento mecânico em pacientes com doença periodontal associada ao *A. actinomycetemcomitans*, suprimindo este e obtendo melhora do status periodontal até 24 meses após o tratamento ativo.

O gel de metronidazol 25% parece ter o mesmo desempenho da raspagem subgengival em relação a parâmetros clínicos (profundidade de sondagem e sangramento gengival) quando utilizado sem orientação adicional de higiene (semelhante ao nosso delineamento), em um período de 6 meses¹¹⁴, chegando-se a sugerir que, antimicrobianos de ação tópica como o metronidazol, reduziriam e até evitariam o tratamento cirúrgico^{58, 59}.

Uma vez que nosso estudo demonstrou redução até cerca de 6 meses nos parâmetros clínicos avaliados e, muito próximo de 3 meses observamos diminuição considerável no número da bactéria estudada, poderíamos estar sugerindo uma utilização supervisionada com um intervalo de 3 meses, a qual deverá ser combinada com o retorno periódico para reavaliação e manutenção pelo profissional, recurso este muito comumente empregado pelos odontopediatras em seus programas de prevenção em clínicas privadas e públicas. Esta manutenção poderia representar, através do quimioterápico, um meio auxiliar efetivo na limitação ou prevenção das doenças gengivais¹⁴. Lembrando ainda que as terapias periodontais não-cirúrgicas, baseadas nos conceitos atuais de placa e doença periodontal, apresentam como facilitador o fato de que é possível a sua realização pelo clínico geral ou até mesmo pela THD, onde a intervenção profissional associada com a caseira, notadamente, é capaz de produzir melhoras na saúde periodontal destes pacientes, em particular os diabéticos¹⁰.

Este trabalho de acompanhamento quando realizado de forma multidisciplinar, em conjunto com o médico endocrinologista, será sempre bem-vindo e incentivado, providenciando benefícios à saúde geral do paciente e maior qualidade de vida²¹. Ressalta-se ainda que o estado glicêmico alterado não somente altera os parâmetros gengivais, mas também causa modificações nos padrões salivares como fluxo, pH salivar, capacidade tampão e atividade da peroxidase^{6, 41, 60}, além de outros comprometimentos sistêmicos.

Embora alguns estudos tenham sinalizado que uma menor concentração de metronidazol (entre 0,5, 1 e 5%) possa apresentar resultados positivos para o controle da periodontite^{39, 75, 91}, outros estudos mais recentes, que investigaram o efeito bactericida e bacteriostático desta droga^{34, 35}, observaram que o melhor efeito bacteriostático está nas concentrações entre

20-25% e o máximo efeito bactericida em 25%, com a concentração de 1% falhando em eliminar a microbiota aeróbica e anaeróbica.

Enfim, a liberação local de agentes para o tratamento de doenças periodontais já vem sendo investigada desde o final dos anos 70, tendo-se desenhado vários sistemas⁴⁸ e, atualmente, oferece um novo conceito para o tratamento da doença localizada¹²⁷.

Um parâmetro clínico como o índice de placa ou mesmo o índice gengival, corroborado por uma avaliação microbiológica sempre é mais confiável. Para esse fim, a utilização de um teste rápido, não invasivo e de fácil execução, quando comparado à cultura de bactérias anaeróbicas (padrão ouro para análise de placa subgengival)¹², como a Real-Time PCR, um método extremamente sensível e confiável^{11, 12, 63, 80, 81}, pode com o tempo tornar-se de grande valia para o clínico, sendo inegável que a detecção de grupos específicos de patógenos periodontais irá norteá-lo na condução do tratamento para suprimir a expressão destes⁴⁰. A coleta de saliva, assim como o seu armazenamento^{77, 78} está tornando-se cada vez mais facilitada. Constituindo uma fonte de amostras significativa das bactérias presentes na cavidade oral com razoável confiabilidade^{16, 77, 78, 86}. Para a faixa etária com que trabalhamos, devemos lembrar que há que se considerar o manejo do comportamento deste paciente, o qual guarda características próprias que, uma vez negligenciadas, poderá acarretar prejuízos para o sucesso da intervenção. Assim, faz-se necessário uma abordagem própria para o diabético infantil e adolescente.

O uso do artifício da escovação para empregar uma medicação de ação local, diferente do depósito diretamente no sulco gengival como o utilizado pelo sistema Eyzol 25% Dental Gel^{1, 3, 5, 7, 15, 48, 51, 82, 85, 94, 96, 114, 115, 116} o qual foi referência para o delineamento deste trabalho; a necessidade dos pais ou responsáveis pela criança acompanharem a administração da droga; o fato do seguimento do paciente poder ser avaliado por parâmetros clínicos e, futuramente, por avaliações laboratoriais (Real-Time PCR); constituem fatores positivos para a instituição deste tipo de terapia preventiva. Alguns autores^{43, 123} referem-se às técnicas que utilizam a PCR como instrumentos de uso futuro, face à rápida difusão deste método nas pesquisas clínicas.

Transformar-se-ão em ferramenta de extrema valia e de uso cotidiano para o cirurgião-dentista tão logo esteja a custo acessível, o que a

tornará semelhante a um exame laboratorial comum e de rotina como, por exemplo, um exame de sangue para verificação da glicemia, com a vantagem de poder ser realizado sem agredir a criança, através da análise de sua saliva, que poderá ser coletada e armazenada no consultório até o envio a um laboratório especializado.

Ainda que a PCR demonstre-se excelente para a identificação de periodontopatógenos, quando há a necessidade de quantificá-los este método não apresenta a qualificação desejada⁴².

Dessa forma, há algum tempo utiliza-se a Real-Time PCR para investigar periodontopatógenos^{11, 12, 43, 53, 81} com resultados satisfatórios, os quais poderão ser obtidos através de amostras de saliva do paciente, sendo esta bem aceita como fonte de bactérias^{16, 77, 78, 110, 118}. O método de investigação molecular representado pela Real-Time PCR vem se transformando em um suporte excelente, permitindo um diagnóstico rápido, abrindo oportunidade para detectar patógenos orais¹², dentre estes, a bactéria considerada neste estudo. Se ponderarmos a necessidade de quantificação destes microrganismos, ainda assim, a técnica empregada constitui um método de confiabilidade extrema, mesmo quando esta identificação ocorrer em indivíduos saudáveis⁸¹, como aconteceu nas amostras avaliadas. Comparada ao método de cultura para detecção de *A. actinomycetemcomitans*, a sensibilidade e especificidade da Real-Time PCR apresenta concordâncias excelentes, em torno de 67% e 100% respectivamente⁴³, apresentando-se como uma alternativa para o diagnóstico quantitativo de culturas anaeróbicas¹¹. Tal fato pode ser corroborado ao utilizar-se como controle positivo de nossa avaliação a porção 16S r-RNA, onde todas as amostras (32) detectaram a presença de microrganismos na cavidade oral. Alguns autores ressaltaram a sua característica de permitir aos pesquisadores contornar a etapa de cultivo, sendo esta qualidade, reconhecidamente, de utilidade em avaliações da composição microbiana da cavidade oral, inclusive na doença periodontal¹⁰¹.

Não somente a técnica é importante quando se quer uma acurada quantificação de bactérias, mas também, um sistema adequado deve ser utilizado. Ao que parece, a utilização do SYBR Green em nosso trabalho também foi uma escolha acertada, em concordância ao estudo de MAEDA et al.⁶³, 2003, onde confirmamos uma detecção de 1 a $1 \times 10^{(7)}$ UFC do *A.*

actinomycescomitans, demonstrando assim a Real-Time PCR, nas reações realizadas, sensibilidade, especificidade e capacidade de quantificação adequada ao estudo executado.

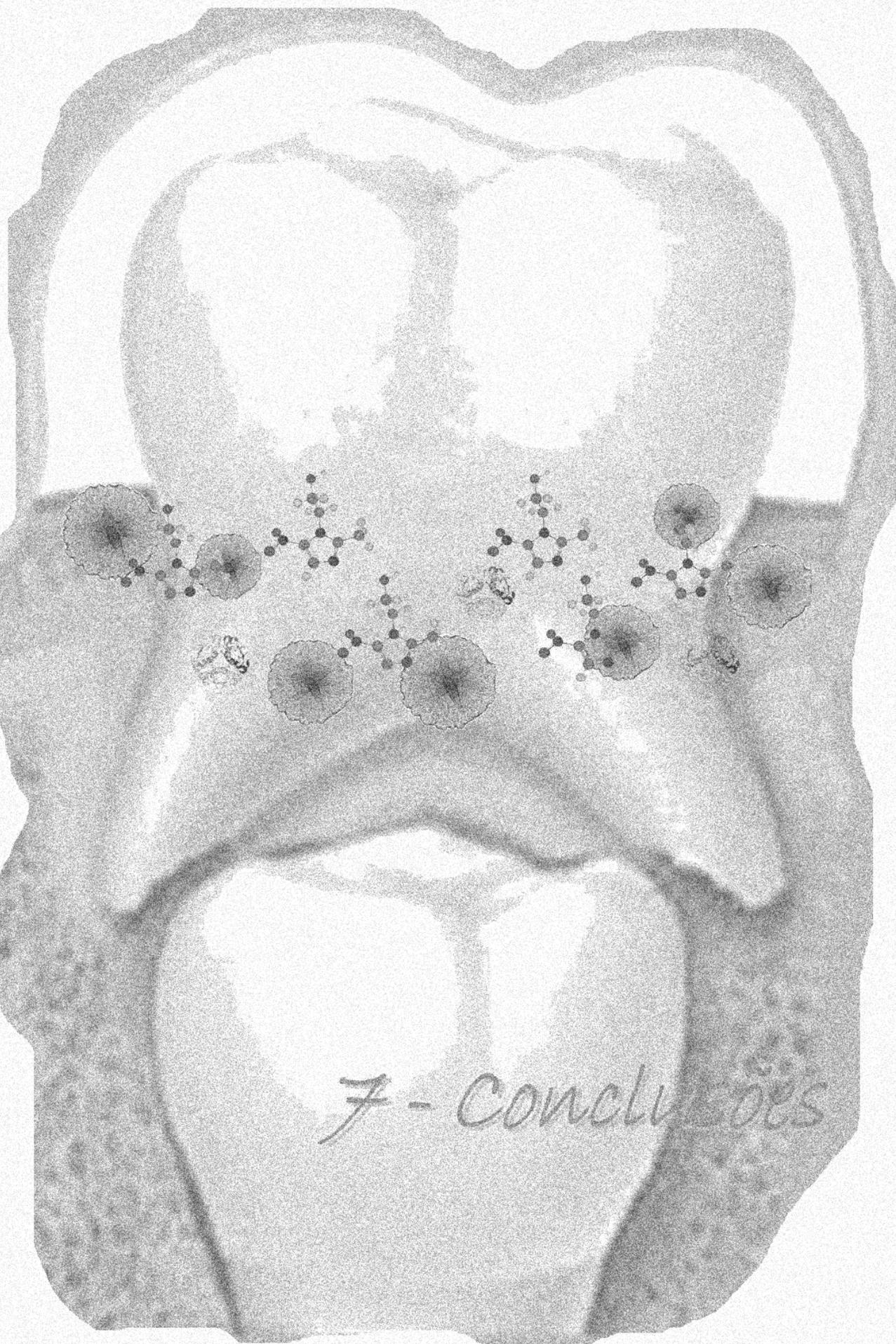
Se considerarmos que a análise quantitativa, identificando bactérias que possam interferir no processo da doença periodontal, é importante para a prevenção, o diagnóstico, acompanhamento terapêutico e avaliação de risco à enfermidade⁵³, então, ao escolher uma técnica segura como a Real-Time PCR, devemos também certificar-nos de que a coleta de material para as reações esteja compatível com o público alvo a ser submetido a este tipo de procedimento.

Dessa forma, a literatura tem apontado a saliva como uma fonte promissora de DNA, viável, potencialmente útil e alternativa, mas ainda pouco explorada para estudos^{16, 77}. Além da execução de sua coleta ser relativamente simples, o seu armazenamento não é tão crítico e causa pouco impacto na qualidade do DNA e sua fidelidade genotípica⁷⁷, mesmo quando armazenada em condições inferiores àquelas consideradas ótimas⁷⁸.

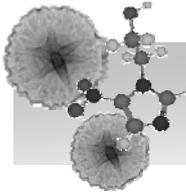
Estas considerações são importantes, pois nortearam o armazenamento das nossas amostras, visto que durante todo o período do estudo estiveram congeladas a temperatura de -20°C. Ainda em relação à viabilidade do uso de saliva como meio de amostragem, CORTELLI et al.¹⁶, 2005, sugere que a saliva não estimulada, tal qual foi utilizada no presente trabalho, é uma mistura representativa de amostras de placa subgengival e seu uso é apropriado para detecção oral de *A. actinomycescomitans*.

Por fim, abordagens moleculares podem ser úteis na determinação de populações que hospedem o *A. actinomycescomitans*, sendo a saliva uma fonte tão útil quanto confiável de DNA genômico, capaz até de abrigar formas de RNA⁸⁶, constituindo assim uma inovação frente às pesquisas.

Desta feita, à luz da literatura existente, os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para o direcionamento daqueles que têm como alvo de cuidado profissional e/ou pesquisa, crianças e adolescentes portadores de IDDM e, assim, atuar preventivamente para que as condições bucais destes pacientes se mantenham adequadas, minimizando o desconforto e a necessidade de outros tipos de tratamento e intervenções.



F - Conclusões



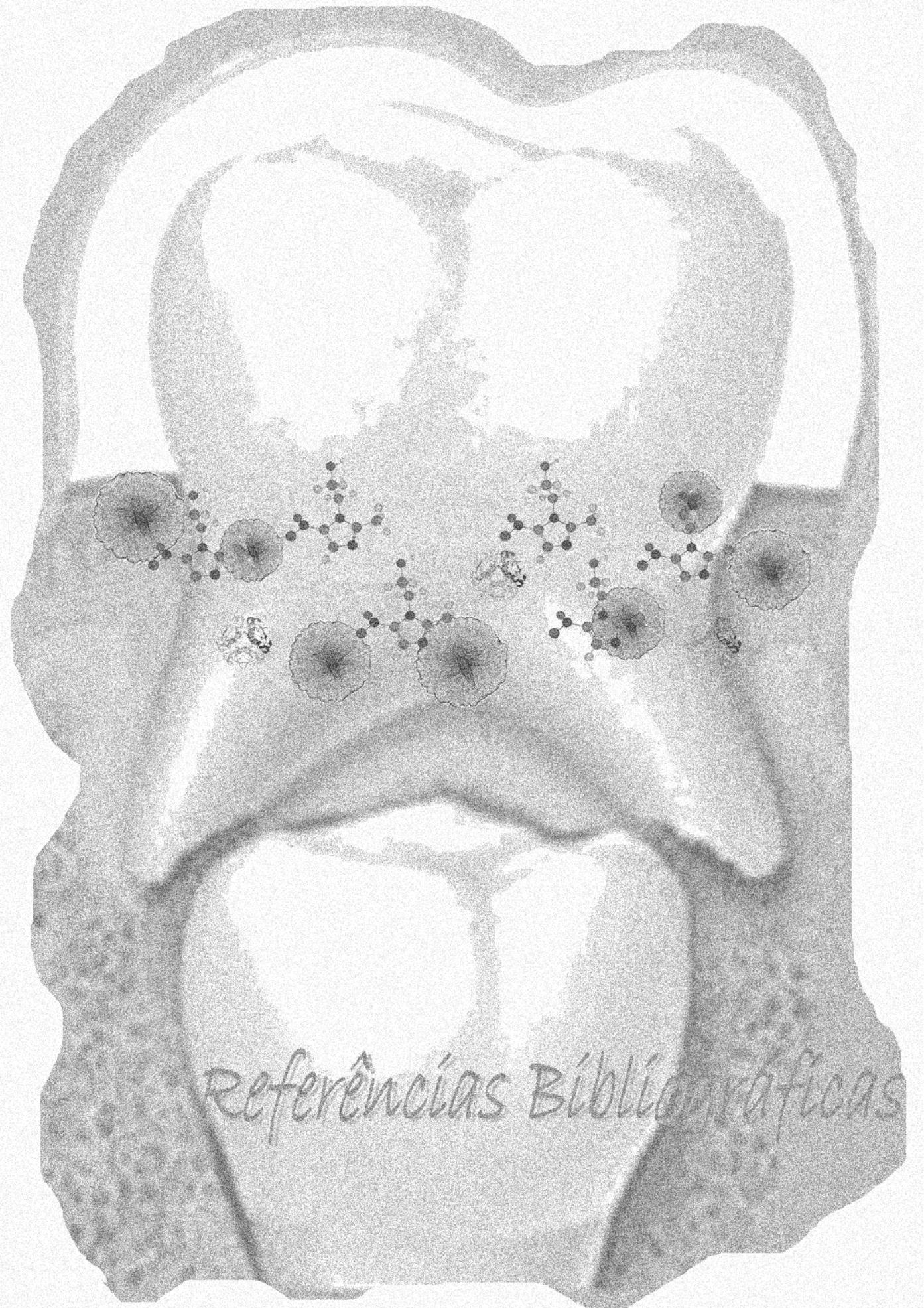
7 - CONCLUSÕES

Os resultados observados neste estudo demonstraram que:

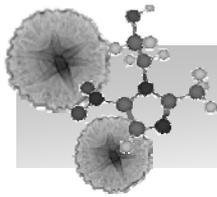
- ⊕ A porcentagem de indivíduos estudados, positivos para a presença de *A. actinomycetemcomitans* foi muito baixa.
- ⊕ O gel de metronidazol 25% reduziu o número de UFC de *A. actinomycetemcomitans* após o seu uso, segundo o protocolo recomendado, nos indivíduos positivos para esta bactéria. Esta redução foi observada com significância até cerca de 3 meses após seu uso.
- ⊕ O uso do gel de metronidazol 25% reduziu significativamente os índices de placa e gengival até 6 meses após sua aplicação, quando começam novamente a se elevar, mas parece não influenciar a profundidade de sondagem
- ⊕ Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados – diabéticos e não diabéticos - para IP e IG; evidenciam que o grupo diabético apresenta-se estatisticamente significativa com maior profundidade de sondagem do que o grupo não diabético, e sugerem não haver diferença entre diabéticos e não diabéticos para a presença de *A. actinomycetemcomitans*.

Assim concluiu-se que:

- ⊕ A ocorrência do *A. actinomycetemcomitans* foi baixa nos grupos estudados.
- ⊕ O gel de metronidazol 25% foi efetivo para reduzir os índices de placa, gengival e a contagem de *A. actinomycetemcomitans* até 3 meses após o seu uso.
- ⊕ Para a amostra estudada, a diferença entre os grupos diabético e não diabético restringiu-se à profundidade de sondagem.



Referências Bibliográficas



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(ABNT NBR 6023:2002)

1. AINAMO, J. et al. Clinical responses to subgingival application of a metronidazole 25% gel compared to the effect of subgingival scaling in adult periodontitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 19, n. 9, p. 723-729, Oct. 1992.
2. AKERBLOM, H. K. et al. Environmental factors in etiology of type I diabetes. **Am J Med Genet**, New York, v. 115, n. 1, p. 18-29, May 2002.
3. AL-MUBARAK, S. A.; KARRING, T.; HO, A. Clinical evaluation of subgingival application of metronidazole 25% and adjunctive therapy. **J Int Acad Periodontol**, London, v. 2, n. 3, p. 64-70, July 2000.
4. ANTCHAK, A. A.; TANG, J.; CHALMERS, T. Quality assessment of randomized trials in dental research: I. methods. **J Periodontol Res**, Copenhagen, v. 21, n. 4, p. 305-314, Jul. 1986 apud KNOLL-KOHLER, E. Metronidazole dental gel as an alternative to scaling and root planning in the treatment of localized adult periodontitis. Is its efficacy proved? **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 107, n. 6, p. 415-421, Dec. 1999.
5. ANTIBIOTIC gel for periodontal disease. **Drug Ther Bull**, London, v. 32, n. 6, p. 43-44, June 1994.
6. AREN, G. et al. Periodontal health, salivary status and metabolic control in children with type I diabetes mellitus. **J Periodontol**, London, v. 74, n. 12, p. 1789-1795, Dec. 2003.
7. AWARTANI, F. A.; ZULQARNAIN, B. J. Comparison of the clinical effects of subgingival application of metronidazole 25% gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. **Quintessence Int**, Berlin, v. 29, n. 1, p. 41-48, Jan. 1998.

8. BEGG, C. et al. Improving the quality of reporting of randomized controlled trials: the CONSORT Statement. *J Am Med Assoc*, Chicago, v. 276, n. 8, p. 637-639, Aug. 1996 apud KNOLL-KOHLER, E. Metronidazole dental gel as an alternative to scaling and root planning in the treatment of localized adult periodontitis. Is its efficacy proved? **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 107, n. 6, p. 415-421, Dec. 1999.
9. BEIKLER, T. et al. Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. **J Periodontol**, Chicago, v. 77, n. 8, p. 1323-1332, Aug. 2006.
10. BHASKAR, S. N. Four steps to soft tissue management: non-surgical periodontal therapy. **Dent Today**, Montclair, v. 14, n. 10, p. 30, 32, 34-39, Oct. 1995.
11. BOUTAGA, K. et al. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. **FEMS Immunol Med Microbiol**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 191-199, Aug. 2005.
12. BOUTAGA, K. et al. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 33, n. 6, p. 427-433, June 2006.
13. CAMPUS, G. et al. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. **J Periodontol**, Chicago, v. 76, n. 3, p. 418-425, Mar. 2005.
14. CIANCO, S. G. Current dental chemotherapeutics, Part 2. **Dent Today**, Montclair, v. 16, n. 3, p. 48, 50, Mar. 1997.
15. COLGATE – PALMOLIVE Ltd. UK. **Elyzol 25% dental gel**: prescribing information. Disponível em:
<<http://www.health.gov.il/units//pharmacy/trufot/alonim/1130.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2005.

16. CORTELLI, S. C. et al. Detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. **J Periodontol**, Chicago, v. 76, n. 2, p. 204-209, Feb. 2005.
17. COSTA, A. A.; ALMEIDA NETO, J. S. **Manual de Diabetes, fatores que precipitam o aparecimento do diabetes**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1998. 156 p.
18. DAHLÉN, G. Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. **Adv Dent Res**, Washington, v. 7, n. 2, p. 163-174, Aug. 1993.
19. DICIONÁRIO Houaiss da Língua Portuguesa. Disponível em: <<http://houaiss.uol.com.br/busca.jhtm>>. Acesso em: 25 jan. 2007.
20. EISENMANN, A. C. et al. Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. **J Periodontol**, Chicago, v. 54, n. 12, p. 712-713, Dec. 1983.
21. FENESY, K.E. Periodontal disease: an overview for physicians. **Mt Sinai J Med**, Baltimore, v.65, n. 5-6, p. 362-369, Oct./Nov. 1998.
22. FERREIRA, S. R. G. et al. Population-Based Incidence of IDDM in the State of São Paulo, Brazil. **Diabetes Care**, New York, v. 16, n. 5, p. 701-704, May 1993.
23. FIRATLI, E.; YILMAZ, O.; ONAN, U. The relationship between clinical attachment loss and the duration of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in children and adolescents. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 23, n. 4, p. 362-366, Apr. 1996.
24. FIRATLI, E. The relationship between clinical periodontal status and insulin-dependent diabetes mellitus. Results after 5 years. **J Periodontol**, Chicago, v. 68, n. 2, p. 136-140, Feb. 1997.

25. FOURNIOL FILHO, A. Odontologia hospitalar e atendimento odontológico. In: _____. **Pacientes especiais e a odontologia**. São Paulo: Ed. Santos, 1998. cap. 3, p. 197-214.
26. FRANDSEN, E. V. et al. Effect of local metronidazole application on periodontal healing following guided tissue regeneration. Microbiological findings. **J Periodontol**, Chicago, v. 65, n. 10, p. 921-928, Oct. 1994.
27. GAFAN, G. P. et al. Prevalence of periodontal pathogens in dental plaque of children. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 42, n. 9, p. 4141-4146, Sept. 2004.
28. GARLET, G. P. et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. **Microbes Infect**, Paris, v. 7, n. 4, p. 738-747, Apr. 2005.
29. GARLET, G. P. et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. **Clin Exp Immunol**, Oxford, v. 147, n. 1, p. 128-138, Jan. 2007.
30. GENCO, R. J. Using antimicrobial agents to manage periodontal diseases. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 122, n. 10, p. 30-38, Sept. 1991.
31. GREENSTEIN, G. The role of metronidazole in the treatment of periodontal diseases. **J Periodontol**, Chicago, v. 64, n. 1, p. 1-15, Jan. 1993.
32. GREGHI, S. L. A. et al. Relação entre diabetes mellitus e doença periodontal. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 265-269, jul./ago. 2002.

33. GROSSI, S. G.; GENCO, R. J. Periodontal disease and Diabetes Mellitus: a two-way relationship. **Ann Periodontol**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 51-61, July 1998.
34. GRUDIANOV, A. I.; DMITRIEVA, N. A.; OVCHINNIKOVA, V. V. Validation of the optimal concentration of Metrogil-denta preparations in the treatment of periodontal inflammations. **Stomatologiia (Mosk)**, Moskva, v. 81, n. 1, p. 44-47, 2002.
35. GRUDIANOV, A.I.; OVCHINNIKOVA, V. V.; DMITRIEVA, N. A. Comparison of antibacterial efficacy of 1 and 25% concentration of Metrogil-denta for inflammatory periodontal disease treatment. **Stomatologiia (Mosk)**, Moskva, v. 85, n. 4, p. 26-9, 2006.
36. GUSBERTI, F. A. et al. Puberty gingivitis in insulin-dependent diabetic children. I, Cross-sectional observations. **J Periodontol**, Chicago, v. 54, n. 12, p. 714-720, Dec. 1983.
37. HANCOCK, E. B.; NEWELL, D. H. Antimicrobials in periodontal practice. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 719-731, Oct. 1994.
38. HARASZTHY, V. I. et al. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. **J Periodontol**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 912-922, June 2000.
39. HITZIG, C. et al. Topical metronidazole as an adjunct to subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 21 n. 2, p. 146-151, Feb. 1994.
40. HOWELL, T. H. Chemotherapeutic agents as adjuncts in the treatment of periodontal disease. **Curr Opin Dent**, Philadelphia, v. 1, n. 1, p. 81-86, Feb. 1991.

41. IUGHETTI, L. et al. Oral health in children and adolescents with IDDM: a review. **J Pediatr Endocrinol Metab**, London, v. 12, n. 5, p. 603-610, 1999. Supplement 2.
42. JANSSON, H. et al. The microbial outcome observed with polymerase chain reaction in subjects with recurrent periodontal disease following local treatment with 25% metronidazole gel. **Swed Dent J**, Jönköping, v. 28, n. 2, p. 67-76, 2004.
43. JERVOE-STORM, P. M. et al. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaques samples. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 32, n. 7, p. 778-783, July 2005.
44. KARJALAINEM, K. M.; KNUUTTILA, M. L. The onset of diabetes and poor metabolic control increases gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 23, n. 12, p. 1060-1067, Dec. 1996.
45. KIBIRIGE, M. et al. Testing the accelerator hypothesis: the relationship between body mass and age at diagnosis of type I diabetes. **Diabetes Care**, New York, v. 26, n. 10, p. 2954-2956, Oct. 2003.
46. KILLOY, W. J. Chemical treatment of periodontitis: local delivery of antimicrobials. **Int Dent J**, London, v. 48, n. 3, p. 305-315, June 1998. Supplement 1.
47. KIMURA, S. et al. Periodontopathic bacterial infection in childhood. **J Periodontol**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 20-26, Jan. 2002.
48. KINANE, D. F. Local antimicrobial therapies in periodontal disease. **Ann R Australas Coll Dent Surg**, Sydney, v. 15, p. 57-60. Oct. 2000.

49. KLEINFELDER, J. W.; MULLER, R. F.; LANGE, D. E. Intraoral persistence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontally healthy subjects following treatment of diseased family members. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 26, n. 9, p. 583-589, Sept. 1999.
50. KNIP, M.; AKERBLOM, H. K. Environmental factors in the pathogenesis of type I diabetes mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, Heidelberg, v. 107, p. s93-100, 1999. Supplement 3.
51. KNOLL-KOHLER, E. Metronidazole dental gel as an alternative to scaling and root planning in the treatment of localized adult periodontitis. Is its efficacy proved? **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 107, n. 6, p. 415-421, Dec. 1999.
52. KONO, T. et al. Human fibroblasts ubiquitously express glutamic acid decarboxylase 65 (GAD 65): possible effects of connective tissue inflammation on GAD antibody titer. **J Periodontol**, Chicago, v. 72, n. 5, p. 598-604, May 2001.
53. KUBONIWA, M. et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 19, n. 3, p. 168-176, June 2004.
54. LIBMAN, I. M. et al. Evidence for heterogeneous pathogenesis of insulin-treated diabetes in black and white children. **Diabetes Care**, New York, v. 26, n. 10, p. 2876-2882, Oct. 2003.
55. LIBMAN, I. M. et al. Changing prevalence of overweight children and adolescents at onset of insulin-treated diabetes. **Diabetes Care**, New York, v. 26, n. 10, p. 2954-2956, Oct. 2003.
56. LÖE, H. The gingival index, plaque index and retention index systems. **J Periodontol**, Chicago, v. 38, n. 6, p. 610-616, Nov./Dec. 1967. Supplement.

57. LOESCHE, W. J.; GROSSMAN, N.; GIORDANO, J. Metronidazole in periodontitis (IV): the effect of patient compliance on treatment parameters. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 96-104, Feb. 1993.
58. LOESCHE, W. J.; GIORDANO, J. R. Metronidazole in periodontitis (V): debridement should precede medication. **Compendium**, Newtown, v. 15, n. 10, p. 1198, 1201, 1203 passim, Oct. 1994. Quiz 1218.
59. LOESCHE, W. J. et al. Nonsurgical treatment of patients with periodontal disease. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 81, n. 5, p. 533-543, May 1996.
60. LOPEZ, M. E. et al. Salivary characteristics of diabetic children. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 1, p. 26-31, July 2003.
61. LOPEZ, N. J.; MELLADO, J. C.; LEIGHTON, G. X. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 23, n. 2, p. 101-105, Feb. 1996.
62. LUDVIGSSON, J. Why diabetes incidence increases: a unifying theory. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v. 1079, p. 374-382, Oct. 2006.
63. MAEDA, H. et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. **FEMS Immunol Med Microbiol**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 81-86, Oct. 2003.
64. MAGNUSSON, I. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontitis. **Compend Contin Educ Dent**, Jamesburg, v. 19, n. 10, p. 953-956, 958, 960 passim, Oct. 1998. Quiz 966.

65. MANDELL, R. L. et al. Microbiology of healthy and diseased periodontal sites in poorly controlled insulin dependent diabetics. **J Periodontol**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 274-279, Apr. 1992.
66. MARTINDALE. **The complete drug reference**. 33rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2002.
67. MARTINDALE. **The extra pharmacopeia**. 33rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2002. p. 594-597.
68. McDONALD, R. E.; AVERY, D. R.; WEDDELL, J. A. Gengivite e doença periodontal. In: McDONALD, R. E.; AVERY, D. R. **Odontopediatria**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995. cap. 20, p. 310-341.
69. McEVOY, G. K. **Ahfs drug information 2003**. Bethesda: American Society Health-System Pharmacists, 2003. p. 856-866, 3395-3401.
70. MORINUSHI, T. et al. Humoral immune response to selected subgingival plaque microorganisms in insulin-dependent diabetic children. **J Periodontol**, Chicago, v. 60, n. 4, p. 199-204, Apr. 1989.
71. MORINUSHI, T. et al. The relationship between gingivitis and colonization by Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans in children. **J Periodontol**, Chicago, v. 71, n. 3, p. 403-409, Mar. 2000.
72. MURDOCH-KINCH, C. A. Oral medicine: advances in diagnostic procedures. **J Calif Dent Assoc**, Sacramento, v. 27, n. 10, p. 773-780, 782-784, Oct. 1999.
73. NAKAGAWA, S. et al. Subgingival microflora in children of early childhood, school age and circumpuberty: the proportion and frequency of gram-negative bacteria in periodontally healthy and gingivitis groups. **Shoni Shikagaku Zasshi**, Tokyo, v. 29, n. 1, p. 72-85, 1991.

74. NAKAGAWA, S. et al. Infection by Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans and antibody response at different in humans. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v. 29, n. 1, p. 9-16, Jan. 1994.
75. NEWMAN, H. N. et al. Slow release metronidazole and a simplified mechanical oral hygiene regimen in the control of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 11, n. 9, p. 576-582, Oct 1984.
76. NISHIMURA, F. et al. Periodontal disease as a complication of diabetes mellitus. **Ann Periodontol**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 20-29, July 1998.
77. NG, D. P. et al. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 343, n. 1-2, p. 191-194, May 2004.
78. NG, D. P. et al. Saliva as viable alternative source of human genomic DNA in genetic. **Clin Chim Acta**, Amsterdam, v. 367, n. 1-2, p. 81-85, May 2006.
79. NOACK, B. et al. Metabolic diseases and their possible link to risk indicators of periodontitis. **J Periodontol**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 898-903, June 2000.
80. NONNENMACHER, C. et al. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. **J Microbiol Methods**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 117-125, Oct. 2004.
81. NONNENMACHER, C. et al. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. **J Periodontol**, Chicago, v. 76, n. 9, p. 1542-1549, Sept. 2005.
82. NOYAN, U. et al. A clinical e microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 24, n. 3, p. 158-165, Mar. 1997.

83. OKADA, M.; HAYASHI, F.; NAGASAKA, N. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 27, n. 10, p. 763-768, Oct. 2000.
84. OOSHIMA, T. et al. Occurrence of periodontal bacteria in healthy children: a 2-year longitudinal study. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v. 31, n. 6, p. 417-425, Dec. 2003.
85. PALMER, R. M.; MATTHEWS, J. P.; WILSON, R. F. Adjunctive systemic and locally delivered metronidazole in the treatment of periodontitis: a controlled clinical study. **Br Dent J**, London, v. 184, n. 11, p. 548-552, June 1998.
86. PARK, N. J. et al. Characterization of RNA in saliva. **Clin Chem**, Baltimore, v. 52, n. 6, p. 988-994, June 2006.
87. PAVICIC, M. J. et al. Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis: a 2-year evaluation. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 21, n. 2, p. 107-112, Feb. 1994.
88. PAVICIC, M. J. et al. Metronidazole susceptibility factors in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Antimicrob Chemother**, London, v. 35, n. 2, p. 263-269, Feb. 1995.
89. PDR. **Physicians' desk reference**. 55 ed. Monvale. Medical Economics, 2001. p. 3002-30006.
90. PEREA, E. J. Oral flora in the age of molecular biology. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, Valencia, v. 9, p. 6-10, 2004. Supplement.

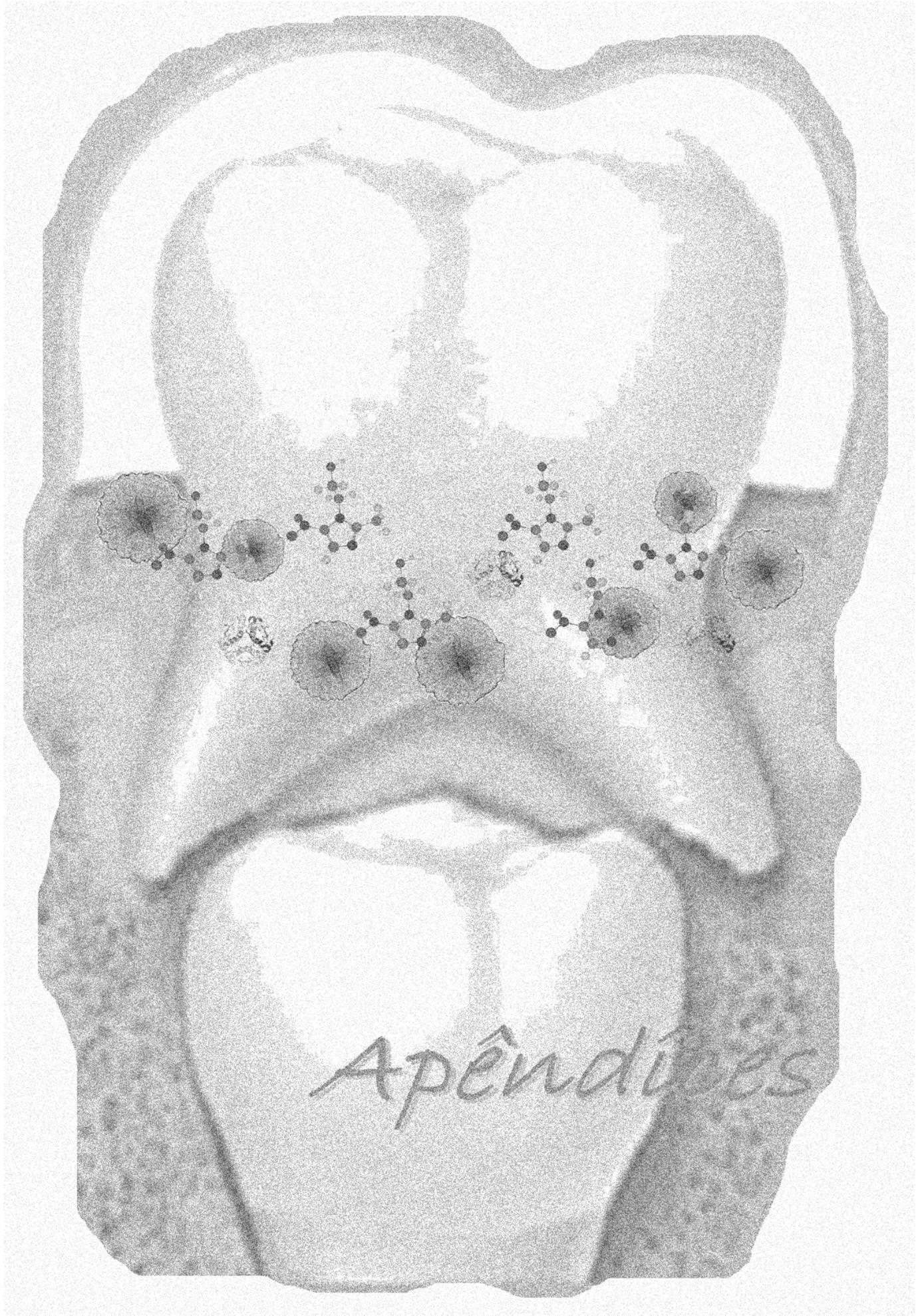
91. PICCOLOMINI, R. et al. Bacteriological and clinical follow-up of periodontal pockets during topically applied 1% metronidazole-gel therapy in patients with adult periodontitis. **New Microbiol**, Pavia, v. 22, n. 3, p. 219-225, July 1999.
92. PINDUCCIU, G. et al. Periodontal disease, oral microbial flora and salivary antibacterial factors in diabetes mellitus type I patients. **Eur J Epidemiol**, Rome, v. 12, n. 6, p. 631-636, Dec. 1996.
93. POULET, P. P.; DUFFAUT, D.; LODTER, J. P. Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 26, n. 4, p. 261-263, Apr. 1999.
94. RIEP, B. PURUCKER, P.; BERNIMOULIN, J. P. Repeated local metronidazole-therapy as adjunct to scaling and root planning in maintenance patients. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 26, n. 11, p. 710-715, Nov. 1999.
95. ROTZETTER, P. A. et al. Kinetics of spiramycin/metronidazole (Rodogyl) in human gingival crevicular fluid, saliva and blood. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 21, n. 9, p. 595-600, Oct. 1994.
96. RUDHART, A. et al. Local metronidazole application in maintenance patients. Clinical and microbiological evaluation. **J Periodontol**, Copenhagen, v. 69, n. 10, p. 1148-1154, Oct. 1998.
97. RUBY, J. D. et al. Genetic characterization of the oral Actinomyces. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 47, n. 6, p. 457-463, June 2002.
98. RUPF, S. et al. Comparison of different techniques of quantitative PCR for determination of Streptococcus mutans counts in saliva samples. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 50-53, Feb. 2003.

99. SAKAI, V. T. **Biologia molecular: princípios e aplicação das técnicas de PCR e RT-PCR em odontologia**. 2002. 55 p. Monografia (Programa Especial de Treinamento) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2002.
100. SAKAI, V. T.; CAMPOS, M. R.; MACHADO, M. A. A. M.; LAURIS, J. R.; GREENE, A. S.; SANTOS, C. F. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. **Int J Paediatr Dent**, Oxford, v. 17, n. 3, p.192-199, May 2007.
101. SAKAMOTO, M.; UMEDA, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of human oral microbiota. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v. 40, n. 3, p. 277-285, June 2005.
102. SALVI, G. E.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. PGE₂, IL-1 β , and TNF- α responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. **Ann Periodontol**, Copenhagen, v. 3, n. 1, p. 40-50, July 1998.
103. SANDER, L. et al. Effect of local metronidazole application on periodontal healing following guided tissue regeneration. Clinical findings. **J Periodontol**, Chicago, v. 65, n. 10, p. 914-920, Oct. 1994.
104. SAXEN, L.; ASIKAINEN, S. Metronidazole in the treatment of localized juvenile periodontitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 20, n. 3, p. 166-171, Mar. 1993.
105. SAWAMOTO, Y. et al. Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 20, n. 4, p. 216-220, Aug. 2005.
106. SBORDONE, L. et al. Periodontal status and subgingival microbiota of insulin-dependent juvenile diabetics: a 3-year longitudinal study. **J Periodontol**, Chicago, v. 69, n. 2, p. 120-128, Feb 1998.

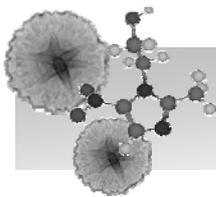
107. SEWON, L. et al. The limited value of three pathogen species in predicting healing of periodontal pockets. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, v. 57, n. 5, p. 267-270, Oct. 1999.
108. SIEMIATYCKI, J. et al. Incidence of IDDM in Montreal by ethnic group and by social class and comparisons with ethnic group living elsewhere. **Diabetes**, New York, v. 37, n. 8, p. 1096-1102, Aug. 1998.
109. SILVA, M. C. **Análise histológica e radiográfica das alterações periodontais provocadas pela indução do diabetes em ratos**. 2007. 141 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.
110. SIRINIAN, G. et al. Periodontopathic bacteria in young healthy subjects of different ethnic background in Los Angeles. **J Periodontol**, Chicago, v. 73, n. 3, p. 283-288, Mar. 2002.
111. SIXOU, J. L.; ROBERT, J. C.; BONNAURE-MALLET, M. Loss of deciduous teeth and germs of permanent incisors in a 4-year-old child. An atypical prepuberal periodontitis? A clinical microbiological, immunological and ultrastructural study. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 24, n. 11, p. 836-843, Nov. 1997.
112. SONIS, A. Doenças da boca e manifestações orais de doenças sistêmicas. In: PINKHAN, J. R. **Odontopediatria: da infância à adolescência**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1996. cap. 5, p. 77-92.
113. STEIN, S. H. et al. Interleukin-10 promotes anti-collagen antibody production in type I diabetic peripheral B lymphocytes. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v. 32, n. 1, pt 2, p. 189-195, Jan. 1997.

114. STELZEL, M.; FLORES-DE-JACOBY, L. Topical metronidazole application compared with subgingival scaling. A clinical and microbiological study on recall patients. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 23, n. 1, p. 24-29, Jan. 1996.
115. STOLTZE, K.; STELLFELD, M. Systemic absorption of metronidazole after application of a metronidazole 25% dental gel. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 19, n. 9, pt 2, p. 693-7, Oct. 1992.
116. STOLTZE, K. Concentration of metronidazole in periodontal pockets after application of a metronidazole 25% dental gel. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 19, n. 9, pt 2, p. 698-701, Oct. 1992.
117. TAKAHASHI, K. et al. Subgingival microflora and antibody response against periodontal bacteria of young Japanese patients with type 1 diabetes mellitus. **J Int Acad Periodontol**, London, v. 3, n. 4, p. 104-111, Oct. 2001.
118. TAMURA, K. et al. Distribution of 10 periodontal bacteria in saliva samples from Japanese children and their mothers. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.51, n. 5, p. 371-377, May 2006.
119. THORSTENSSON, H.; DAHLÉN, G.; HUGOSON, A. Some suspected periodontopathogens and serum antibody response in adult long-duration insulin-dependent diabetics. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 22, n. 6, p. 449-458, June 1995.
120. TIMMERMAN, M. F. et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents: longitudinal clinical data and prospective clinical and microbiological risk assessment. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 27, n. 12, p. 932-942, Dec. 2000.

121. TIMMERMAN, M. F. et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents: sub gingival microbiota in relation to experience progression of periodontitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v. 28, n. 7, p. 617-627, July 2001.
122. TOLEDO, O. A. Doença periodontal na criança. In: _____.
Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica. 2. ed. São Paulo: Editorial Premier, 1996. cap. 5, p. 89-103.
123. TRAN, S. D.; RUDNEY, J. D. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 34, n. 11, p. 2674-2678, Nov. 1996.
124. UMEDA, M. et al. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. **J Periodontol**, Chicago, n. 69, v. 7, p. 828-833, July 1998.
125. UNLU, F. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: comparison of healthy and diabetic patients. **J Periodontol**, Chicago, v. 74, n. 2, p. 181-187, Feb. 2003.
126. USP DI: **Drug information for the health care professional**. 17th ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 1997. p. 2024-2032.
127. WALKER, C.; KARPINIA, K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. **J Periodontol**, Chicago, v. 73, n. 10, p. 1188-1196, Oct. 2002.
128. ZAMBON, J. J.; CHRISTERSSON, L. A.; SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. **J Periodontol**, Chicago, n. 54, v. 12, p. 707-711, Dec. 1983.



Apêndices



APÊNDICES

APÊNDICE A

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BACTÉRIA A PARTIR DE SALIVA

Descongelar os tubos contendo as amostras de saliva em gelo picado; agitar o tubo contendo saliva em um agitador de tubos tipo vórtex; pipetar 500µL da amostra em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL; acrescentar 1000 µL de água destilada estéril; agitar no vórtex; centrifugar a 10.000g por 5 min (4° C); descartar o sobrenadante e repetir 1000µL de água, vórtex e centrifuga 3 vezes; após descartar o sobrenadante pela última vez, adicionar ao tubo 100µL de água livre de DNase e RNase + 100µL de InstaGene Matrix e incubar a 56° C por 30 min; agitar no vórtex em alta velocidade por 10 s; ferver o tubo em 100° C durante 10 min; agitar novamente em vórtex por 10 s; centrifugar a 10.000g por 3 min (4° C); pipetar 170µL em um tubo de microcentrífuga estéril de 5 mL e descartar o restante; realizar cada reação de Real-Time PCR utilizando alíquotas deste conteúdo analisadas em espectrofotômetro, padronizando-as de modo a conter 5 ng de DNA bacteriano.

APÊNDICE B

METODOLOGIA PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA
QUANTIFICAÇÃO DE *A. actinomycetemcomitans*

A partir dos estoques congelados a -20°C , em meio *skim-milk* (Difco Labs, EUA), foram removidos 10 μL de suspensão, com alça de platina calibrada estéril, estriados em agar AAGM (AAGMA) e incubados a 37°C , sob atmosfera de 10% CO_2 (Water-Jacked CO_2 Incubators/Cole Palmer Instruments, EUA) durante 48h. Após crescimento, colônias isoladas foram inoculadas em 5mL de caldo AAGM e incubadas sob as mesmas condições durante 18h.

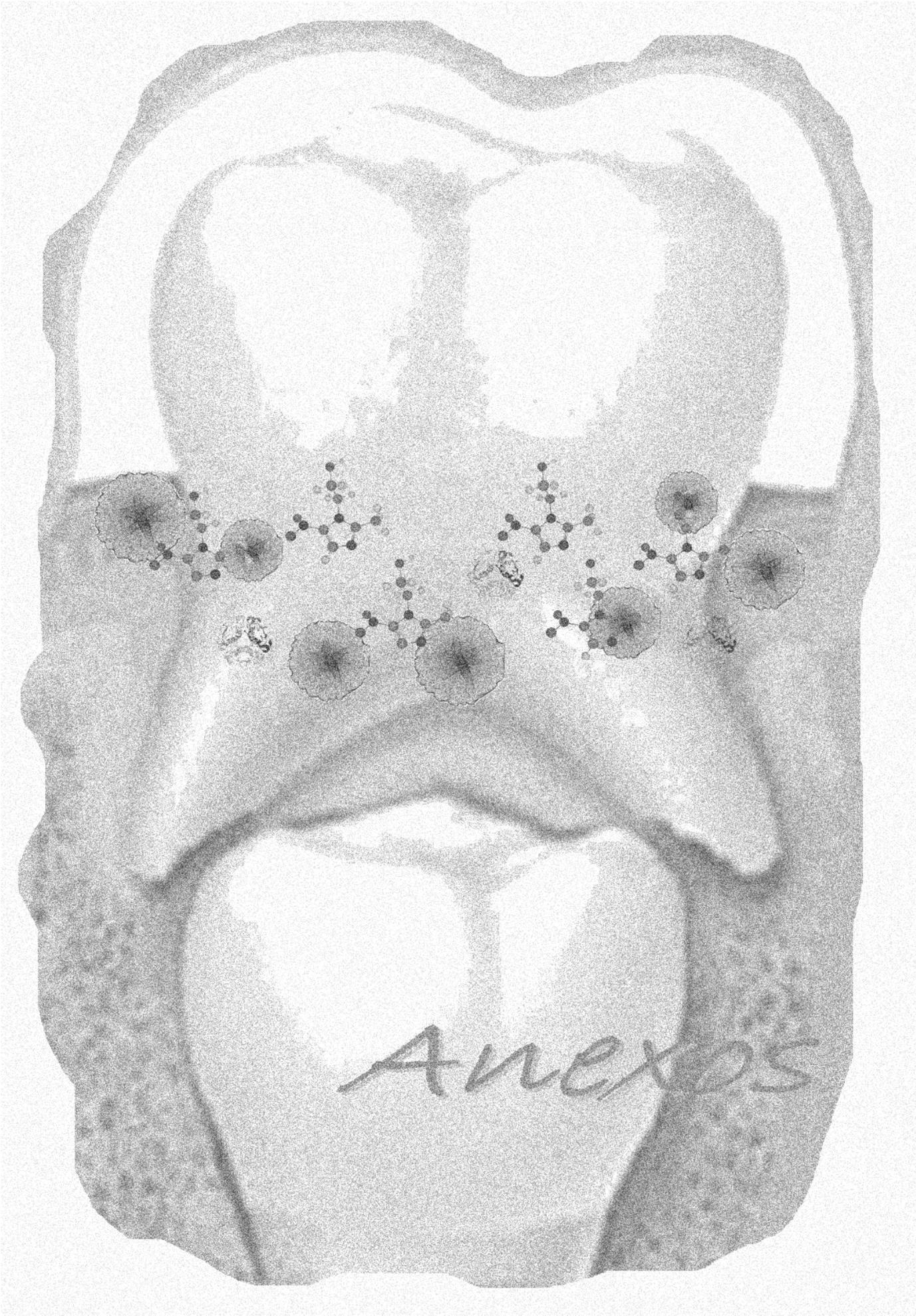
Alíquotas da cultura foram avaliadas em microscopia ótica sob coloração de Gram, para verificação de ausência de contaminantes. A seguir, foram realizadas as leituras de absorvância ($A_{550\text{nm}}$) em espectrofotômetro Genesys 2 (Spectronic Unicam, EUA).

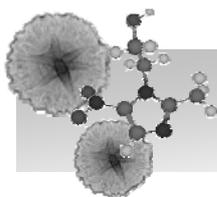
Os ensaios de crescimento foram realizados em tubos de polietileno com tampa rosqueável de capacidade de 50mL (Greiner, Alemanha), com inóculo padronizado (a partir de volumes variáveis da cultura de origem, no caso de dias diferentes de cultivo), para uma densidade final de $A_{550\text{nm}} = 0,100$ em 5mL de caldo AAGM estéril.

Para determinação da curva de crescimento, tubos idênticos foram incubados em atmosfera de anaerobiose (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2) de zero (*start* de $A_{550\text{nm}} = 0,100$) a 24 horas e avaliados gradualmente em espectrofotômetro. A densidade ótica máxima alcançada foi de $A_{550\text{nm}} = 0,670$ em dezessete horas, determinando o início da fase estacionária de crescimento. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado durante o estágio de crescimento exponencial, através de diluições seriadas e semeadura em meio AAGMA (80% N_2 , 10% CO_2 , 10% H_2 ; 37°C ; 48h) e contagem.

Em posse dos dados, a coleta da célula foi realizada dentro da fase exponencial de crescimento ($A_{550\text{nm}} = 0,781$, 12 horas de cultivo) a partir de um tubo com 5mL.

Partindo de um valor conhecido de $1,46 \times 10^{(9)}$ UFC/mL ($A_{550nm} = 0,403$), para $A_{550nm} = 0,781$ encontrou-se um valor de $2,8294 \times 10^{(9)}$ UFC / mL de caldo AAGM, de onde foi extraído o DNA para as diluições seriadas, necessárias à construção da curva padrão, que variou de $1 \times 10^{(-2)}$ a $1 \times 10^{(7)}$ UFC de *A. actinomycetemcomitans*, para comparação com as leituras das amostras dos indivíduos participantes do estudo, após a execução da Real-Time PCR.





ANEXOS

Anexo A



Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (3235-8356)

Processo nº 06/2005

Bauru, 2 de maio de 2005.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada referente ao projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa “**Detecção precoce de bactérias periodontopatogênicas, e a ação de um gel de metronidazol 25% em crianças com Diabetes Mellitus - tipo I**” de autoria de Marcelo Pires Prestes, sob sua orientação, foi novamente analisado e considerado **APROVADO**, em reunião deste Comitê realizada no dia 27 de abril de 2005.

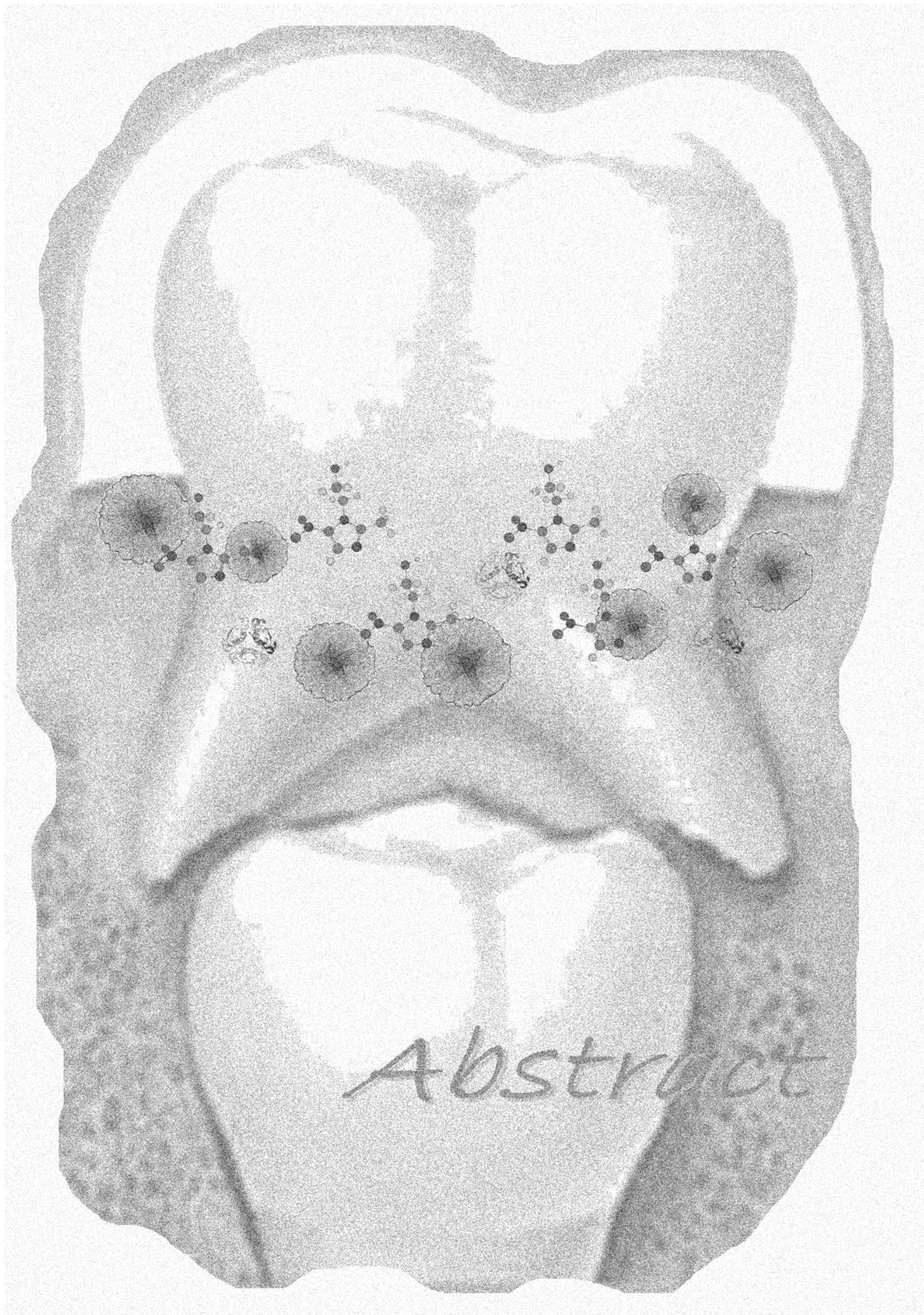
Informamos ainda, que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

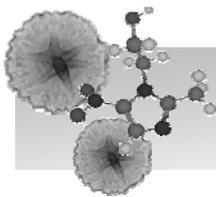
Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

Ilm^a Sr^a Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
DD. Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

Marcelo Pires Prestes



Abstract



ABSTRACT

Early detection of periodontopathogenic bacteria and the effect of a topic metronidazole 25% gel in children with type I Diabetes mellitus.

Type I Diabetes mellitus (IDDM) is a metabolic disease characterized by deficiency on the insulin production, causing great systemic alterations, including at the oral cavity. Periodontal disease is more aggressive in diabetic patients, even during the childhood, and presents as etiological microorganisms the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), formerly *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. This microorganisms in association to alterations in the immune and inflammatory answers caused by diabetes, can promote a larger and early alveolar bone resorption even in children. So, the early identification of these aggressors could be extremely useful for the institution of preventive and therapeutic measures in order to inhibit or minimize the noxious effects of IDDM and their consequences in the oral cavity. Aiming this early identification, molecular biology methods of investigation are being used more frequently, pointing out the Real Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR), which presents high specificity and sensibility to detect and to quantify microorganisms, even in small number and in different media little explored like saliva. The use of a safe topical antibiotic, such as metronidazole 25% gel, which used in association with dental brushing, could reduce or eliminate *A. actinomycetemcomitans*, avoiding the progression of the periodontal disease. This study evaluated the presence of *A. actinomycetemcomitans* before and after the use of metronidazole 25% gel once a day, in substitution to one of the daily teeth brushing. It also evaluated the influence of this treatment protocol on the plaque, gingival and probing depth indexes. Thirty-two children, aging from 3 to 12 years were included in this study and they were divided into two groups: type I diabetic (D) and no diabetic (ND). Real-Time PCR methods were used to evaluate the presence of *A. actinomycetemcomitans*. The obtained data suggest that metronidazole 25%

gel, applied according to the established protocol in this study, effectively reduced plaque and gingival indexes and the number of *A. actinomycetemcomitans*. However, no influence was observed regarding the probing depth. The obtained data suggest that, although the number of bacteria has been small and the difference between the D and ND groups was not observed only regarding probing depth, the studied antibiotic gel demonstrated to be promising in preventing periodontal disease in diabetic children. More randomized clinical trials are necessary for a final conclusion.

Key words: *Diabetes mellitus, Gingival diseases, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Metronidazole, Polymerase chain reaction.*