

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PPG MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Rodrigo Célio Guiducci

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL POR PCR, ANTES E
APÓS A TERAPIA MECÂNICA, EM PACIENTES COM
PERIODONTITE CRÔNICA: ESTUDO DA EFICÁCIA DO
TRATAMENTO**

Juiz de Fora
2010

RODRIGO CÉLIO GUIDUCCI

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL POR PCR, ANTES E
APÓS A TERAPIA MECÂNICA, EM PACIENTES COM
PERIODONTITE CRÔNICA: ESTUDO DA EFICÁCIA DO
TRATAMENTO**

Dissertação apresentada ao PPG-
Mestrado em Clínica Odontológica da
Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Juiz de Fora,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Odontologia, Área
de concentração Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Juiz de Fora

2010

Guiducci, Rodrigo Celio

Avaliação da microbiota subgingival por PCR, antes e após a terapia mecânica, em pacientes com periodontite crônica: estudo da eficácia do tratamento. / Rodrigo Celio Guiducci. -- 2010.

124 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Periodontopatogenos. 2 Terapia mecânica. 3. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). I. Título.

“Avaliação da Microbiota Subgengival por PCR antes e após a terapia mecânica em pacientes com periodontite crônica: Estudo da eficácia de tratamento”

Rodrigo Célio Guiducci

ORIENTADOR (A): Maria das Graças Afonso de Miranda Chaves

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Aprovado (a) em 20 / 04 / 2010

mgachaves.

Prof^a. Dr^a Maria das Graças Afonso Miranda Chaves

Aneliese de Holetz Toledo Lourenço.

Prof^a. Dr^a. Aneliese de Holetz Toledo Lourenço

Henrique Duque de Miranda Chaves Netto.

Prof. Dr. Henrique Duque de Miranda Chaves Netto

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu pai Sebastião, que mesmo não estando presente fisicamente, seu legado me impulsiona a cada dia na busca de ser uma pessoa melhor, e a minha mãe Célia, que me ensina bons exemplos através de seus atos cotidianos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus, sem sua ajuda e luz nada teria sido feito.

Agradeço especialmente a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria das Graças, por ter acreditado neste projeto e tê-lo acolhido e por constantemente apoiar e incentivar meu crescimento pessoal e profissional. Seus ensinamentos e sua serenidade foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Cláudio Galuppo Diniz, exemplo de dedicação a ciência com ética e responsabilidade, acolheu-me inteiramente e ensinou-me muito sobre pesquisa. Formou em mim valores que definem o que espero ser como professor.

À minha irmã Lisa, pelo incentivo e dedicação, quando eu apenas pensava em fazer mestrado.

Ao Renato, Rosiane, Beatriz, Maria Clara e Alicia, minha avó Manoelita, meus tios, tias, primos e primas que são fontes de alegria.

Aos meus amigos: Ronaldo (Nardim) Figueiredo, Vagner M. Vilela, Mateus, Henrique Duque Netto, Flávio Carvalho, Luis Gustavo Abrantes, Igor Torres Carneiro, Fabiano Fusaro, Marcelo Mares Guia, Jean Marcel, Glaucia Arleu, Isabela Defilipo, Marília Zambolim, Milene de Oliveira e Nathalia Andrade por direta ou indiretamente participarem deste projeto.

Aos amigos da Embrapa, especialmente ao Robert Domingues, este projeto tem muito de vocês.

Aos professores do Mestrado em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFFJ, que são eles: Prof^a. Fabíola Leite, Prof^a. Karina Lopes de Vitto, Prof. Celso Neiva Campos, Prof. Marcos Vinícius Queiroz, Prof. Antonio Márcio Resende, e

Às amigas do ICB: Prof^a. Dr^a. Vânia Lucia, Jéssica Bastos e à Prof^a. Gísele Duarte Garcia que participou ativamente deste trabalho.

Ao Professor Dr. Alfredo Chaoubah que participou da construção numérica deste projeto e a engenheira Nara Linhares, que me auxiliou nas estatísticas desta pesquisa.

Aos professores do Mestrado em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFFJ, que são eles: Prof^a. Fabíola Leite, Prof^a. Karina Lopes de Vitto, Prof. Celso Neiva Campos, Prof. Marcos Vinícius Queiroz, Prof. Antonio Márcio Resende, e especialmente à Prof^a. Neuza de Souza Picorelli que muito me ajudou nesta pesquisa.

Agradeço ainda a todos os amigos do Mestrado e à Secretária Wanessa Alonso que muito colaborou nesta caminhada.

Agradeço também aos funcionários da Faculdade de Odontologia da UFFJ e a todos os pacientes que aceitaram espontaneamente participar deste estudo.

Obrigado a todos vocês.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

RESUMO

GUIDUCCI, R.C. **Avaliação da microbiota subgengival por PCR, antes e após a terapia mecânica, em pacientes com periodontite crônica: estudo da eficácia do tratamento.** 2010. 124 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* - Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG).

RESUMO

A periodontite é conceituada como uma doença infecciosa persistente, com resposta inflamatória dos tecidos de suporte que envolve os dentes, incluindo ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. O reflexo clínico do envolvimento das estruturas de suporte é a formação de bolsas subgengivais, perda de inserção clínica e sangramento gengival. O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia da terapia periodontal mecânica como forma de tratamento da periodontite, analisando pacientes antes e após terapia para dados clínicos como profundidade de bolsa subgengival, índice de placa e sangramento a sondagem. Foi avaliada a presença e ou ausência de microrganismos subgengivais periodontopatogênicos como *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivallis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella nigrescens*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia* nos momentos pré e pós terapia através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Obteve-se índices de sucesso na redução qualitativa destes patógenos, implicando diretamente na efetiva melhoria da redução da profundidade de bolsa subgengival, redução do número de pacientes com sangramento e do índice de placa encontrado nestes pacientes após terapia. Espécies como *Porphyromonas gingivallis* quando reduzidas pela terapia implicam na maior média de redução de profundidade de bolsa e espécies como *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia* quando reduzidos refletem na recuperação de sangramento e cálculo periodontal nos doentes periodontais. Pode-se concluir que a doença periodontal é multifatorial existindo uma interdependência entre as bactérias responsáveis por sua etiologia, e que a terapia periodontal mecânica pode reduzir estas bactérias, mas não erradicá-las. Ao final de 3 meses após terapia, existe uma recolonização bacteriana, sendo preponderante a higiene bucal do paciente e sua predisposição

para novos ciclos de ativação da doença periodontal. A reação da polimerase em cadeia (PCR) mostrou se efetiva ferramenta para diagnóstico e prognóstico da doença periodontal.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontopatogenos; Terapia mecânica; Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).

.

ABSTRACT

GUIDUCCI, R.C. **Avaliação da microbiota subgengival por PCR, antes e após a terapia mecânica, em pacientes com periodontite crônica: estudo da eficácia do tratamento.** 2010. 124 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* - Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG).

ABSTRACT

Periodontitis is defined as a persistent infectious disease with inflammation of supporting tissues surrounding the teeth, including periodontal ligament, cementum and alveolar bone. The reflection of the clinical involvement of the supporting structures is the formation of subgingival pockets, clinical attachment loss and gingival bleeding. The aim of this study was to assess the effectiveness of mechanical periodontal therapy as treatment of periodontitis by examining patients before and after therapy to clinical data as subgingival pocket depth, plaque index and bleeding on probing. Was evaluated and the presence or absence of subgingival microorganisms as periodontopathogenic *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivallis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella nigrescens*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia* in the moments before and after therapy by the Polymerase Reaction chain reaction (PCR). Obtained if the success rate in reducing these pathogens qualitative, involving directly in the effective improvement of reduced depth of subgingival pocket, reducing the number of patients with bleeding and plaque index found in these patients after therapy. Species such as *Porphyromonas gingivallis* reduced by therapy implies the highest average reduction of pocket depth and species as *Agreggatibacter actinomycetemcomitans* and *Prevotella intermedia* as reflected in reduced recovery of periodontal bleeding and calculus in periodontal patients. It can be concluded that periodontal disease is multifactorial and there is an interdependence between the bacteria responsible for its etiology, and that mechanical periodontal therapy may reduce these bacteria, but not eradicate them. At the end of three months after therapy, there is a bacterial recolonization, being predominantly oral hygiene of patients and their predisposition to new cycles of

activation of periodontal disease. The polymerase chain reaction (PCR) has proved to be an effective tool for diagnosis and prognosis of periodontal disease.

KEYWORDS: Periodontal; Mechanical therapy; Reaction polymerase chain (PCR).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	– <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>
ANOVA	– Análise de Variância
BOP	– Sangramento a sondagem
C	– Celsius
CAL	– Níveis de inserção clínica
CO ₂	– Gás carbônico
CON	– Grupo controle
Cr	– <i>Campylobacter rectus</i>
CV	– Coeficiente de variação
dATP	– Desoxirribonucleotídeos Fosfatados Adenina
dCTP	– Desoxirribonucleotídeos Fosfatados Citosina
dGTP	– Desoxirribonucleotídeos Fosfatados Guanina
dTTP	– Desoxirribonucleotídeos Fosfatados Timina
DL	– Face Disto Lingual
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
DV	– Face Disto Vestibular
Ec	– <i>Eikenella corrodens</i>
Fn	– <i>Fusobacterium nucleatum</i>
L	– Face Lingual
MgCl	– Cloreto de Magnésio
ml	– Microlitro
ML	– Face Mésio Lingual
MV	– Face Mésio Vestibular
P	– Face Palatina
pb	– Pares de base
PC	– Periodontite Crônica
PCR	– Reação da Polimerase em Cadeia
PD	– Profundidade de Bolsa

PS	– Profundidade de Sondagem
Pi	– <i>Prevotella intermedia</i>
Pg	– <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Pn	– <i>Prevotella nigrescens</i>
PP	– Ponta de papel
Taq	– Enzima polimerase <i>Thermus aquaticus</i>
Td	– <i>Treponema denticola</i>
Tf	– <i>Tannerella forsythia</i>
KCL	– Cloreto de Potássio
Kg/cm ²	– Kilograma por centímetro quadrado
KV	– Kilovolts
L	– Litros
Min.	– Minutos
mm	– Milímetros
mm ²	– Milímetros quadrados
P	– Face palatina
pH	– Potencial de hidrogênio
<i>S. mutans</i>	– <i>Streptococcus mutans</i>
USP	– Universidade de São Paulo
UV	– Ultra violeta
V	– Face vestibular
VMGA	– Meio viável para transporte de anaeróbios em meio salivar
μL	– Microlitro
16sRNA	– Sub unidade 16 do RNA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	A, B e C: Sondagem de profundidade de bolsas pré- tratamento ..	74
Figura 2	A, B e C: Coleta de raspado subgingival pré-operatório e armazenamento em tubos Eppendorf	74
Figura 3	A, B e C: Coleta de amostra 90 dias após terapia mecânica através de cones de papel	75
Figura 4	A e B: Fases da terapia mecânica.....	76
Figura 5	Imagem Eletroforética de bandas contendo DNAs bacterianos universais	78
Quadro 1	<i>Primers</i> para a análise de PCR.....	80
Gráfico 1	Análise de redução bacteriana pré e pós-terapia por número de pacientes.....	84
Gráfico 2	Valores de média aritmética em mm de profundidade de bolsas subgingivais antes e após terapia.....	85
Gráfico 3	Valores de frequência absoluta de sintomas clínicos pré e pós-terapia.....	86
Gráfico 4	Redução do número de bactérias e profundidade de bolsa após tratamento em mm.....	90
Gráfico 5	Pacientes positivos pré-terapia para bactéria e sangramento X paciente negativo pós-terapia para bactéria e sangramento	91
Gráfico 6	Comparativo entre bactérias e cálculo pré-tratamento.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de pacientes positivos para cada bactéria	84
Tabela 2	Médias aritméticas de profundidades de bolsa pré X pós-terapia e significância clínica (P)	85
Tabela 3	Valores de frequência absoluta de sintomas clínicos pré e pós-terapia.....	86
Tabela 4	Redução de bactéria e profundidade de bolsa após tratamento	90
Tabela 5	Pacientes positivos para bactérias e sangramento X negativos após tratamento	91
Tabela 6	Comparativa entre bactérias e cálculos positivos pré-terapia X bactéria e cálculo negativo após terapia.....	92

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	14
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Patógenos periodontais e classificações da doença periodontal	21
2.2 Terapia Periodontal Mecânica: Raspagem, Alisamento e Polimento Radicular – RAP	39
2.3 Reação da Polimerase em Cadeia	59
3 PROPOSIÇÃO	69
4 MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1 Materiais	72
4.2 Métodos	72
4.2.1 Seleção dos Pacientes	72
4.2.2 Critérios de Diagnósticos Clínicos	73
4.2.3 Coleta e Armazenagem das amostras de placa	74
4.2.4 Terapia Mecânica	76
4.2.5 Análise microbiológica dos espécimes coletados	76
4.2.6 Obtenção do DNA bacteriano	77
4.2.7 Detecção de DNA bacteriano nos extratos obtidos (PCR Universal) ...	77
4.2.8 Detecção de patógenos periodontais bacterianos	78
4.2.9 Análise Estatística	80
5 RESULTADOS	81
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXOS	116

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é conceituada como uma doença infecciosa persistente, com resposta inflamatória dos tecidos de suporte que envolve os dentes, incluindo ligamento periodontal, cemento e osso alveolar. O reflexo clínico do envolvimento das estruturas de suporte é a formação de bolsas subgengivais, perda de inserção clínica e sangramento gengival. A maioria dos quadros de periodontites caracteriza-se por inflamação crônica que podem progredir continuamente ou atravessar períodos de exacerbação intercalados por longas fases de quiescência (LOE e ANERUD, 1986; SOCRANSKY et al., 1984); sua prevalência em seres humanos é aproximadamente 30%, sendo que de 10-15% destes possuem a forma severa da doença (OLIVER; BROWN e LOE, 1998).

O processo patogênico das doenças periodontais é, em grande parte, resultante da resposta do hospedeiro à destruição tecidual induzida pelos microorganismos. Na cavidade oral contamos com 30 gêneros diferentes de bactérias e com aproximadamente 500 diferentes espécies de microorganismos. Mesmo com este grande número de patógenos, destacam-se como efetivos na etiologia para a doença periodontal: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Tanerella forsythia* (*Bacteroides forsythus* e *Tanerella forsythensis*), *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivallis*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens* (NORSKOV-LAURITSEN e KILLIAN, 2006).

A terapia periodontal, através da raspagem radicular, baseia-se na remoção de elementos da superfície dentária que provocam inflamação (placa, cálculos, e produtos microbianos) a fim de deter a perda progressiva de inserção, evitando a evolução da doença e a perda do elemento dental. Vários estudos clínicos longitudinais documentaram e comprovaram o êxito desta terapia em pacientes regularmente atendidos (AXELSSON e LINDHE, 1981; KALDAHL et al., 1996; KNOWLES et al., 1979; PIHLSTROM et al., 1983; ROSLING et al., 2001).

Tradicionalmente no diagnóstico bacteriológico das doenças periodontais utiliza-se microscopia, cultura microbiana, antigenemia e sorologia. Estas formas diagnósticas podem ser limitadas pela fraca sensibilidade e também pelo

crescimento lento ou o cultivo pouco viável dos organismos, janelas de detecção estreitas, interpretações complexas, imunossupressão, terapia com antimicrobianos e reações inespecíficas cruzadas (CARMAN et al., 1998; MORILLO et al., 2003; WHELAN e PERSING, 1996; WATANABE e FROMMEL, 1996).

O método da reação da polimerase em cadeia (PCR) surgiu como opção moderna e rápida para suprir as carências diagnósticas apresentadas por outras metodologias, sendo utilizado para identificação direta de patógenos periodontais em amostras subgengivais (AVILA-CAMPOS et al., 1999; SLOTS et al., 1995) e também para esclarecer o papel específico de bactérias na doença periodontal, uma vez que possui a capacidade de detectar com precisão, espécies específicas em populações mistas.

Tendo em vista a eficiência desta metodologia na identificação de patógenos bacterianos, pretende-se avaliar neste estudo, a eficácia clínica do tratamento periodontal, utilizando a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) como identificador de patógenos nos períodos pré e pós-terapia periodontal e analisar ainda a eficiência do tratamento através da comparação dos níveis clínicos da doença periodontal antes e após tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Patógenos periodontais e classificações da doença periodontal

Van Steenberghe et al. (1996) compararam uma sonda de DNA disponível comercialmente com a técnica de cultura convencional para a detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em amostras de placa subgingival. Foram avaliadas amostras de 20 pacientes, entre 39 e 59 anos, com periodontite de moderada a severa, desde o diagnóstico inicial da doença até 15 meses de tratamento. Pontas de papel foram inseridas em quatro bolsas periodontais e enviadas para análise pelo método sonda de DNA Omnigene, e simultaneamente foram colhidas amostras das mesmas bolsas e enviadas para análise por cultura. Uma concordância relativamente baixa foi encontrada entre os métodos, sendo que a taxa de detecção com sonda de DNA foi significativamente mais alta. Nos quadros de doença inicial obteve-se uma alta frequência na detecção da *A.actinomycetemcomitans* e *P.gingivallis* pela técnica da sonda de DNA, enquanto pela técnica da cultura convencional a frequência de detecção de *P.intermedia* foi maior.

Ali et al. (1996) avaliaram a prevalência de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythia*), e *Capnocytophaga* na placa subgingival de 36 pacientes romenos com periodontite do adulto através do método de cultura. Paralelo a técnica de cultura realizou-se a análise por sonda DNA para identificar *P. gingivallis*, *A. actinomycetemcomitans* e *B. forsythus* em bolsas de profundidade ≥ 6 mm e intermediárias 4-5mm nos mesmos indivíduos examinados pela cultura. Foram usadas pontas de papel para extrair as amostras subgingivais. *P. gingivallis* foi identificado em uma alta percentagem de pacientes (75%) e de sítios examinados (63%), seguido por *P.intermedia*, *F.nucleatum* e *A.actinomycetemcomitans*, respectivamente. *Capnocytophaga* estava presente em quase todas as amostras analisadas. Globalmente, a prevalência de patógenos periodontais investigados em pacientes romenos com periodontite é semelhante ao que foi revelado em um correspondente estudo norueguês e em

outras populações de pacientes ocidentais com periodontite. A microbiota subgingival de 42 pacientes camaroneses de 20 a 62 anos de idade foi estudada por Ali et al. (1997) através da técnica de sonda híbrida de DNA e por meio de cultura. Estes pacientes foram divididos em dois grupos sendo 21 pacientes com periodontite e 21 periodontalmente saudáveis. Os pacientes diagnosticados com periodontite possuíam no mínimo quatro bolsas subgingivais de $\geq 6\text{mm}$, enquanto os saudáveis periodontalmente não possuíam sítios com mais que 3mm de profundidade. As amostras foram colhidas destas bolsas nos dois grupos, demonstrando que dos 21 pacientes com periodontite 52,3% foram positivas para *A. actinomycetemcomitans* quando avaliados por sonda de DNA e 28,5% quando o método era cultura. Dos 21 pacientes periodontalmente saudáveis 9,5% tiveram *A. actinomycetemcomitans* detectado por Sonda de DNA. Estes números demonstram uma similaridade na microbiota subgingival da população camaronesa semelhante a de adultos do Ocidente.

Schleget Bregenzer et al. (1998) avaliaram a microflora supra e subgingival através de métodos de cultura e sonda de DNA em 20 indivíduos com idades variando entre 62 e 93 anos. Dez indivíduos tinham gengivite somente e 10 possuíam periodontite. Foram estudadas *T.forsythia* (TF), *P.gingivalis* (PG), *P.Intermedia* (PI), *P.nigrescens* (PN), *A.actinomycetemcomitans* (AA), *T.denticola* (TD) e espiroquetas orais (PROS). No grupo com periodontite a média de profundidade de sondagem foi de 6,7mm e de 2,2 mm no grupo com gengivite, sendo que as médias de inserção clínicas foram de 4,3mm e 1,7mm, respectivamente. As amostras em cultura demonstraram *P.nigrescens* em 10% dos indivíduos com periodontite e 50% dos portadores de gengivite. Nas amostras de placa supra gingival obtidas de periodontite, *Tannerella forsythia* esteve presente em 50%, enquanto que nas amostras de gengivite foram encontradas 60%, sendo que os dados de cultura foram negativos para as duas amostras. *Porphyromonas gingivallis* foi encontrada em 30% das amostras de periodontite e 50 % nas de gengivite, enquanto que para *Treponema Denticola* encontrou se 70% e 30%, respectivamente. O método da sonda de DNA demonstrou presença subgingival de *T.forsythia* (80%), *P.gingivallis* (80%), *P.intermedia* (80%), *A.actinomycetemcomitans* (0%), *T.denticola* (50%) nos pacientes com periodontite, enquanto identificou BF (70%), PG (40%), PI (30%) e TD (20%) em indivíduos com gengivite. Espiroquetas

orais foram encontradas em 80% das amostras de periodontite e 60% das de gengivite. Apenas os achados de *P. intermédia* e *T.denticola* foram associados com definição de doença.

Armitage, em 1999, abordou uma Classificação e Condições de Doenças Periodontais induzidas por placa e uma nova classificação foi estabelecida, incluindo sete tipos gerais de doenças periodontais induzidas por placa: 1) gengivite, 2) periodontite crônica, 3) periodontite agressiva, 4) periodontite como uma manifestação de doenças sistêmicas, 5) doenças periodontais necrosantes 6) abscessos do periodonto, e 7) periodontite associada com lesões endodônticas. Os principais desvios ao sistema anterior de classificação são: 1) o termo "periodontie crônica" foi substituído por "periodontite adulta" e 2) o termo "periodontite agressiva" foi substituída por "periodontite de início precoce."

Mullally et al. (2000) investigaram a prevalência de 8 patógenos periodontais em 31 pacientes femininos e 11 masculinos com média de idades de 30,3 anos. Destes pacientes 17 tinham doença generalizada (GEOP) e 25 possuíam periodontite de início localizada (LEOP). Avaliaram as diferenças microbianas entre as formas de periodontite localizada e generalizada. Amostras de placas subgengivais foram colhidas dos dois grupos de indivíduos e analisadas através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) evidenciando uma prevalência de 78,6% de *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythia*), 88,1% para *Treponema denticola*, 19,0%, de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 16,7%, de *Porphyromonas gingivalis*, 40,4% para *Prevotella intermédia*, 61,9% *Prevotella nigrescens*, 42,3% de *Eikenella corrodens* e 92,8% de *Campylobacter rectus*. Apenas 3 sítios saudáveis portavam um ou mais destes patógenos periodontais. Sete das 8 amostras foram positivas para *A.actinomycetemcomitans* em periodontite de início localizada (LEOP). *P. intermedia* ocorreu em 58,8% de pacientes com periodontite generalizada (GEOP) em comparação com 28% dos indivíduos com periodontite localizada (Leop). Em 82,4% dos sítios com periodontite generalizada (GEOP), *P. nigrescens* esteve presente, enquanto esta bactéria foi detectada em 52% dos sítios com periodontite localizada (Leop). *P. gingivalis* foi isolada a partir de 22,6% das fêmeas, mas não foi isolada de indivíduos do sexo masculino. *C. rectus* foi isolada em todos os indivíduos do sexo feminino em comparação para 72,7% do sexo masculino. *A. actinomycetemcomitans* (37,5%) e *C. rectus* (86,5%) foram mais

frequentemente identificados em não-fumantes em comparação com 7,6% e 68,8% de fumantes, respectivamente. Associações Microbianas coincidiram com a divisão dos casos clínicos em doença periodontal localizada e generalizada em 83% dos indivíduos.

Sanz et al. (2000) desenvolveram um estudo para comparar a microbiota subgingival através de cultura em 31 pacientes espanhóis e 30 holandeses, maiores de 25 anos e com diagnóstico de periodontite. O *A.actinomyetemcomitans* foi significativamente mais prevalente no grupo holandês (23,3%) do que no grupo espanhol (3,2%). A população espanhola foi caracterizada por uma alta prevalência de *P. gingivalis* e baixa de *A. actinomyetemcomitans*, enquanto a população holandesa foi caracterizada por uma alta prevalência de *A. actinomyetemcomitans* e *Peptostreptococcus micros*.

Bong-Kyu et al. (2000) realizaram uma pesquisa com o objetivo de descrever a prevalência dos maiores periodontopatógenos putativos em pacientes coreanos por diferentes métodos de cultura. Foram examinadas 244 amostras de placa subgingival, removidas de 5 sítios em cada participante, os quais foram: 29 adultos com periodontite avançada (PA) e 20 indivíduos periodontalmente saudáveis. As amostras de adultos com periodontite foram retirada de 4 bolsas mais profundas ($\geq 6\text{mm}$) e 1 amostra de sítios sadios ($\leq 3\text{mm}$) de cada paciente. Foi executada a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) utilizando a 16S DNA ribossomal das bactérias encontradas nas amostras de placa subgingival. Em todos os sítios foram encontradas *Fusobacterium sp.*, enquanto *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema sp* e *Bacteroides Forsythus (Tannerella forsythia)* foram detectadas em mais de 96% dos 116 sítios doentes. *Peptostreptococcus micros*, *Actinobacillus actinomyetemcomitans* e *Prevotella intermédia* estavam presentes em 82%, 74% e 71% dos sítios doentes, respectivamente. Nos indivíduos periodontalmente saudáveis, *Fusobacterium sp* foi encontrado em maior proporção (58%). *Treponema sp*, *P.gingivallis* e *T.forsythia* foram detectadas em 22%, 18% e 18% dos sítios saudáveis, respectivamente. A prevalência de periodontopatógenos ,com exceção de *Fusobacterium sp* e *T.forsythia*, foi significativamente maior nos sítios sadios de pacientes com periodontite do que em sítios sadios de pacientes periodontalmente saudáveis.

Takeuchi et al. (2001) realizaram um estudo com o objetivo de identificar *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivallis* pelo método da reação da polimerase em cadeia (PCR) e relacionar a implicação destes patógenos nos parâmetros clínicos da doença periodontal. Utilizaram saliva e placa subgingival de 123 pacientes (38 pacientes com periodontite agressiva, 65 com periodontite crônica e 20 pacientes saudáveis). A frequência de identificação de *T.socranskii*, *T.denticola* e *P.gingivallis* nas amostras de placa de periodontite agressiva foram de 71,1%,73,7% e 84,2% respectivamente, e em periodontite crônica de 89,2%, 93,8% e 95,3%, em pacientes saudáveis periodontalmente foram encontrados os respectivos valores 30%, 5% e 10%. Tanto em periodontite agressiva quanto em periodontite crônica estas 3 espécies de bactérias foram detectadas frequentemente em pacientes que possuíam profundidade de bolsa e perda de inserção clínica. A percentagem dos sítios positivos para estas bactérias aumentou de acordo com o que aumentava os índices de pacientes cronicamente comprometidos. *T. socranskii* foi frequentemente encontrada junto com *T.denticola* ou *P.gingivallis* nos mesmos sítios, e a coexistência destes microorganismos foi frequentemente observada em bolsas periodontais profundas de pacientes com periodontite agressiva. Estes achados sugerem que *T.socranskii*, *T.denticola* e *P.gingivallis* estão associados com a severidade e destruição da doença periodontal.

Avila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002) selecionaram 100 indivíduos, que foram divididos em dois grupos:Grupo 1-pacientes portadores de doença periodontal e Grupo 2-pacientes saudáveis periodontalmente. Todos os pacientes portadores de doença periodontal possuíam perda óssea e profundidade de bolsa superior ou igual a 5mm. Foram colhidas placas subgingival dos pacientes dos dois grupos e analisadas através da Cultura convencional e da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). A detecção bacteriana através do PCR e pela cultura convencional em indivíduos saudáveis e com periodontite foi de 70% e 90% para *A.actinomycescomitans*, 92% e 96% de *F.nucleatum*, 66% e 78% para *P. gingivalis* e, 64% e 84% para *P. intermedia*. Quando o método de cultura convencional foi utilizado para detecção microbiana a partir de indivíduos saudáveis e doentes, observamos as seguintes taxas de isolamento: 48% e 80% para *A. actinomycescomitans*, 60% e 70% para *P. gingivalis*, 64% e 64% para a *E. corrodens*, 84% e 90% para *F. nucleatum*, 50% e 74% para *P. intermedia*, 46% e

60% *C.rectus*, 10% e 40% para *T. forsythia*. Organismos detectados por PCR: *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *E.corrodens*, *P. intermedia* e *T. denticola* foram significativamente associados à doença periodontal com *B. forsythus* de alto índice de OR(2,97, 95% CI 1,88 - 4,70). Bactérias isoladas por meio de Cultura mostraram que *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythus* e *P. intermedia*, foram associados com doença periodontal, mas *P. gingivalis*, *C. rectus*, *E. corrodens* e *F. nucleatum* não foram significativamente associados à doença.

Van Winkelhoff et al. (2002) realizaram estudo comparando a prevalência e proporções numéricas de bactérias periodontais em pacientes com periodontite e pacientes controle. Selecionaram para o estudo 116 indivíduos com diagnóstico de periodontite de moderada a grave com média de idade de 42,4 anos, e 94 indivíduos sem evidências radiográficas de perda óssea alveolar com média de idade de 40,4 anos. As condições gengivais no grupo controle variaram de saúde gengival a vários graus de gengivite. Foram selecionadas as bolsas mais profundas em cada quadrante dos pacientes para cederem amostras subgengivais. Nos indivíduos controle, os sítios mesiais e distais de todos os primeiros molares foram selecionados para amostragem. As amostras retiradas com pontas de papel de cada pacientes foram agrupadas e levadas para cultivo anaeróbico em no máximo 6 horas após a coleta. Relacionou se as variáveis clínicas de cada paciente tais como índice de sangramento a sondagem, profundidade de bolsa e perda de inserção clínica. *A.actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros* foram significativamente mais prevalente em pacientes afetados periodontalmente do que nos controles. Os maiores índices *odds ratios* foram encontrados para *P. gingivalis* e *T. forsythia* (12,3 e 10,4 respectivamente). Outro *odds ratio* variou de 3,1 a 7,7 para *A.actinomycetemcomitans* e *P. micros*, respectivamente. Números absolutos das bactérias-alvo foram mais elevados em todos os pacientes periodontais, mas apenas o percentual médio de *T. forsythia* foi significativamente maior nos pacientes periodontais em comparação aos controles. Concluíram com esta pesquisa que *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* e *P. micros* são todos importantes marcadores para doença periodontal destrutiva em indivíduos adultos. Baseada em *odds ratio* calculados, *T. forsythus*, e *P. gingivalis*

são as bactérias mais fortemente marcadas para esta doença e são infreqüentemente cultivadas a partir de indivíduos sem perda óssea periodontal.

Colombo et al. (2002) determinaram a microbiota subgengival em pacientes brasileiros com periodontite crônica não tratada usando o método da Técnica híbrida da Sonda de DNA. Utilizou-se 25 pacientes periodontais não tratados com média de idade 41,2 anos e média de profundidade de bolsa de 3.3mm, e um grupo controle com 14 pacientes periodontalmente saudáveis com média de idade de 34 anos e de profundidade de sondagem de 1.8mm; estes pacientes foram triados no Departamento de Periodontia da Fac.de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Medidas de profundidade de sondagem, sangramento a sondagem, acúmulo de placa e supuração foram tomadas de 6 sítios (mesiovestibular, mesiolingual, distovestibular, distolingual, vestibular e lingual) em cada dente. Amostras de placa subgengival foram colhidas em 4 sítios em cada dente (mesial, distal, bucal e lingual) de cada paciente em ambos os grupos. A presença e os níveis de 41 espécies bacterianas subgengivais foram determinadas em 4032 amostras de placa usando o método da sonda gênômica do DNA. *T.forsythia*, *P.gingivallis*, *E.nodatum* e *F.nucleatum* ss *vincentii* demonstraram uma significativa correlação positiva com maiores médias de profundidade de sondagem. O grupo com doença periodontal demonstrou altas médias de profundidade de bolsa (3.3mm), sítios com visibilidade de placa (70%) e supuração (14%) em comparação com o grupo controle. Encontraram alta prevalência de *A.actinomycescomitans* em pacientes com periodontite (41%) e também um valor significativo nos periodontalmente saudáveis (25%). *A.actinomycescomitans*, *T.forsythia*, *C.rectus*, *P.intermedia*, *P.nigrescens*, *P.gingivallis* e *T.denticola* foram freqüentemente mais encontrados e em altos níveis em pacientes com periodontite não tratada. Os autores concluíram que a microbiota subgengival de brasileiros com periodontite crônica não tratada era complexa incluindo altas proporções de periodontopatógenos comumente encontrados em outras populações, bem como as espécies incomuns.

Cortelli Jr. (2002) determinou em indivíduos com periodontite crônica e agressiva a prevalência e a freqüência de ocorrência de *A.actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *C. rectus*. Foram incluídos 203 indivíduos, 178 com periodontite crônica (PC) e 25 com periodontite agressiva (PA). Amostras

subgingivais, coletadas dos sítios com as maiores medidas de profundidade à sondagem e perda de inserção clínica, foram avaliadas por ensaio *Dot Blot*. *A. actinomycetemcomitans* foi observado em 72% e 41%, *P. gingivalis* em 80% e 68%, *P. intermedia* em 52% e 53%, *T.forsythia* em 56% e 45%, e *C. rectus* em 48% e 30% respectivamente nos indivíduos com PA e PC. Houve diferença estatisticamente significativa entre a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* e *C. rectus* ambas bactérias mais prevalentes em indivíduos com PA. Em indivíduos com PC foi observada maior frequência para ocorrência simultânea de 3 dentre as 5 espécies pesquisadas, enquanto os indivíduos com PA exibiram maior frequência para ocorrência de 2 bactérias. Concluiu que na população estudada foi observada prevalência elevada de patógenos periodontais com ocorrência mais frequente de 2 ou 3 espécies bacterianas de acordo com o perfil da doença.

Speer et al. (2004) realizaram um estudo para investigar as alterações na flora subgingival de pacientes adultos com periodontite crônica submetidos a tratamento com aparelho ortodôntico fixo. Examinaram através de testes padronizados (Instituto de Microbiologia Médica e Higiene da Universidade de Freiburg, Alemanha) de cultura a presença de patógenos anaeróbios subgingivais em 7 pacientes adultos em diferentes fases do tratamento ortodôntico sendo T1 (antes do tratamento ser iniciado), T2 (6 semanas após o início do tratamento) e T3 (6 semanas após a remoção do aparelho fixo). Durante a terapia com aparelho fixo metálico (Ni Ti® archiwires) ocorreu uma redução acentuada nos níveis de bactérias subgingivais, apesar dos parâmetros clínicos periodontais manterem-se inalterados. Mas com o fim do tratamento a contagem total de bactérias de alta patogenicidade aumentou ligeiramente novamente. Atribuíram esta acentuada melhoria nos níveis bacteriológicos periodontopagênicos durante o tratamento à corrosão do metal liberando íons, principalmente níquel, que têm um efeito tóxico sobre as bactérias e, assim, permite a regeneração da flora bacteriana. Em nenhum dos pacientes foi observada deterioração da saúde periodontal durante e após a terapia ortodôntica.

Hui-Weng et al. (2004) compararam a prevalência e o nível de *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) e *Tannerella forsythia* (*T.forsythia*) em amostras de placas subgingival de indivíduos saudáveis e com doença periodontal, dividindo-os em 2 grupos. Um total de 498 amostras de placas subgingival que foram coletadas de 407 indivíduos diagnosticados com doença periodontal (186

homens e 221 mulheres) com média de idade de 46,8 anos sendo 210 diagnosticados com periodontite do adulto (AP); 78 periodontite de progressão rápida (PPR), e 19 casos de periodontite refratária (PRef.) e 91 indivíduos com saúde periodontal. Amostras foram retiradas com cones de papel de bolsas periodontais com profundidade ≥ 5 mm, após remoção da placa supragengival, e secagem e isolamento do dente. Nos indivíduos periodontalmente saudáveis eram removidas em bolsas com profundidade ≤ 3 mm e sem sinais de inflamação. Utilizaram o método da Imunofluorescência Indireta usando antissoro policlonal espécie - específica para detectar espécies de *P.gingivalis* (FDC381) e espécies de *T.forsythia* (FDC 335). Foram produzidas lâminas com as amostras subgengivais fixadas com uma solução apropriada de antissoro específico para as espécies pesquisadas. Estas lâminas foram visualizadas através de microscópio equipado com fluorescência e escopos de campo escuro. O método da imunofluorescência detectou alta prevalência de *P.gingivalis* de 85.7 e *T.forsythia* 60.7% nos grupos com doença periodontal (AP, PPR e P Ref) comparados com 23.1% e 39.6%, respectivamente, nos saudáveis periodontalmente. *P.gingivalis* foi detectada mais frequentemente em qualquer dos grupos com doença periodontal, do que nos saudáveis. O nível médio de *P.gingivalis* e *T.forsythia* foi significativamente maior em doentes periodontais do que nos saudáveis. Estes dados sugerem que *P.gingivalis* está estritamente associada com a patogênese da periodontite e que não é um habitante normal de indivíduos sem doença periodontal. *T.forsythia* é também importante na patogênese da doença periodontal, todavia, deve ser determinado se é causa da doença periodontal ou se é um invasor secundário nas lesões periodontais.

Boutaga et al. (2005) realizaram um estudo comparativo entre Técnicas de Cultura anaeróbia quantitativa e a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo real para diagnóstico microbiológico de 5 proeminentes patógenos da doença periodontal: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium spp.* Estas espécies foram investigadas em 259 amostras de placas subgengivais de pacientes com periodontite crônica, maiores de 25 anos, com bolsas subgengivais superiores ou igual a 5 mm e com sangramento a sondagem. As amostras foram obtidas das bolsas subgengivais mais profundas em cada quadrante através de pontas de papel

estéril, e divididas em dois grupos, sendo uma processada para cultivo anaeróbio em placas de Agar sangue e outra para a análise através da Extração automatizada de DNA e purificação com o kit isolamento Magna Pura III (Roche Molecular Diagnostics, Almere, The Netherlands) seguindo o protocolo da Reação em Polimerase em Cadeia (PCR). Todas as espécies bacterianas foram corretamente identificadas. O limite inferior de detecção por PCR variou entre 1-50 unidades formadoras de colônias equivalentes, dependendo da espécie. Reatividades não cruzada com DNA heteróloga de outras espécies bacterianas foram observadas. Os resultados da PCR e cultura foram congruentes em 90,3%, 76,8%, 90,7%, 93,8% e 97,4% das amostras para *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. micros* e *Fusobacterium spp*, respectivamente. A maior discrepância entre cultura e PCR foram em amostras cultura-negativa/PCR-positiva que se elevaram 7% para *A. actinomycetemcomitans*, 20% para *P. intermedia*, 7% para *T. forsythia*, 6% para *P. micros*, e 0,8% para a *Fusobacterium spp*. Resultados Cultura-positiva/PCR-negativa foram observados em <3% dos indivíduos de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. micros* e *Fusobacterium spp.*, E em 1,9% das amostras para *P. intermedia*. Os resultados do PCR em tempo real demonstraram um alto grau de concordância com os resultados da cultura anaeróbia, tornando o PCR em tempo real uma alternativa confiável para diagnóstico quantitativo de cultura anaeróbia de amostras de placa subgingival.

Tachibana et al. (2006) realizaram um estudo cujo objetivo consistia em analisar a prevalência de bactérias orais no dorso da língua e ainda obter uma relação entre o numero de dentes e da microflora presente no revestimento da língua em uma população de pessoas com 85 anos de idade atendidos na prefeitura da cidade de Fukuoka, Japão. Foram analisados 205 indivíduos, sendo 89 homens e 116 mulheres da mesma área geográfica. Foram pesquisadas neste estudo 5 bactérias periodontopatogênicas que são *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola* e uma bactéria cariogênica que foi o *Streptococcus mutans*. Amostras da saburra lingual foram coletadas a partir da parte central do dorso da língua através de um rolo de algodão determinando um peso úmido. Antes da coleta das amostras a saliva foi retirada da língua usando um rolo de algodão esterilizado para evitar contaminações. Estas amostras foram analisadas através da Reação da

Polimerase em Cadeia a partir da subunidade 16rRNA das espécies pesquisadas. Os resultados demonstraram que as bactérias periodontais estão presentes em proporções maiores em indivíduos que possuem mais dentes do que em indivíduos com menor número ou ausência de dentes. Entre as bactérias periodontais-positivos e de indivíduos negativos, houve diferenças significativas no número médio de dentes por *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum* e *T. forsythia*, enquanto que não houve diferenças significativas para *A. actinomycetemcomitans* e *S. mutans*. A partir destes resultados, concluíram que uma grande variedade de espécies, incluindo anaeróbios, foi detectada em indivíduos com 85 anos de idade. Constataram que a detecção de bactérias periodontais no revestimento da língua aumentou com o número de dentes. Houve uma relação positiva entre o número de dentes e bactérias periodontopatogênicas, exceto para *A. actinomycetemcomitans*. Estes resultados sugerem que os cuidados com a língua são essenciais para prevenir doenças bucais e precisa fazer parte de qualquer programa de saúde bucal em idosos.

Ximenez-Fyvie et al. (2006) executaram um estudo com objetivo de determinar a composição microbiana da placa subgengival em indivíduos mexicanos com periodontite crônica não tratada. Utilizaram 44 pacientes com doença periodontal crônica (pelo menos oito sítios com perda de inserção clínica ≥ 5 mm e com mais de 30 anos de idade) e 20 pacientes saudáveis periodontalmente (com menos de três sítios com perda de inserção clínica ≤ 3 mm), com mais de 20 anos de idade que fossem não fumantes e que não receberam tratamento periodontal nos últimos meses; todos nascidos no México. Medidas clínicas foram tomadas em seis sítios por cada dente (mésio-vestibulares, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual), excluindo terceiros molares. A avaliação clínica incluiu presença ou ausência de placa, presença ou ausência de eritema gengival, presença ou ausência de sangramento a sondagem, presença ou ausência de supuração, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica, sendo estas duas últimas tomadas duas vezes pelo mesmo examinador e a média destas medidas usadas para análise. As amostras de placas subgengivais foram retiradas dos sítios mésio vestibulares dos 28 dentes de cada indivíduo utilizando curetas estéreis, após secagem e isolamento com rolos de algodão de cada dente. Após a coleta da amostra de todos os indivíduos foram analisados níveis, proporção e prevalência de

40 espécies bacterianas através da Técnica de hibridização DNA-DNA. Os resultados demonstraram que *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, e *Tannerella forsythia* foram as únicas espécies que apresentaram os níveis médios mais elevados em indivíduos com periodontite crônica. As proporções de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e espécies do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *T. denticola*) como um grupo, também foram significativamente maiores nos indivíduos com periodontite. Indivíduos periodontalmente saudáveis portavam uma maior proporção significativa de espécies de *Actinomyces*. Não foram detectadas diferenças significativas nas percentagens de portadores de qualquer uma das espécies testadas. Estes resultados revelaram que a microbiota subgingival em indivíduos mexicanos portadores de periodontite crônica não tratada foi caracterizada por aumento no nível, prevalência e proporção dos patógenos periodontais clássicos. No entanto, a prevalência e proporção de espécies microbianas específicas variaram significativamente comparadas aos resultados de outros estudos de diferentes localizações geográficas.

Krigar et al. (2007) compararam resultados da análise microbiológica de amostras de placas subgingivais através do método da Sonda de RNA. Foram selecionados 220 pacientes da Secção de Periodontia do Departamento de Odontologia do Hospital Universitário Heidelberg, portadores de periodontite agressiva, periodontite crônica generalizada grave ou periodontite como manifestação de doença sistêmica. De cada paciente selecionado foram examinados clinicamente seis sítios em cada dente (mésio vestibular, vestibular, disto vestibular, mésio lingual, lingual e disto lingual), onde eram medidos profundidade de sondagem (PD) e os níveis de perda de inserção clínica vertical (CAL-V) utilizando sonda periodontal manual. A junção cimento esmalte (CEJ) foi utilizada como referência para as medições de inserção clínica. Ainda obtiveram também o registro de sangramento após 30 segundos à sondagem. As três bolsas de maiores profundidades em três diferentes quadrantes foram selecionadas para cederem as amostras. Estas amostras foram colhidas subgingivalmente após remoção da placa supragengival, com cones de papel estéreis inseridos nos pontos mais profundos das bolsas por 10 segundos. Um cone de papel foi colocado em um ponto distinto e transportado por outra via e as outras foram colocadas pontas de papel de cada um dos dois sítios (ensaio de múltiplos sítios). Desta forma obteve-se

4 amostras de cada paciente: três contendo uma ponta de papel cada dos três sítios examinados e uma contendo três pontas de papel agrupados a partir de três locais amostrados (MT3). Foi utilizado para a análise, uma Sonda RNA (test kit aiming) disponível comercialmente para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Tannerella forsythia* (Tf), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), e *Treponema denticola* (Td). Para a análise, todas as contagens bacterianas foram transformadas logaritmicamente. Duas variáveis foram analisadas para cada patógeno periodontal: contagens bacterianas log-transformados e prevalência, ou seja, a detecção do patógeno ou não detecção. Para todos os patógenos testados e analisados para todos os subgrupos, a média do número de bactérias log-transformados foi maior em amostras, em comparação com o valor médio das diferentes amostras. No entanto, para Aa, Pg, e Tf, a análise falhou em detectar diferenças estatisticamente significativas na prevalência entre as amostras separadas e MT3. Apenas para T.d, ocorreu detecção do microorganismo estatisticamente mais significativa frequentemente em MT3 comparada as amostras separadas. Estes achados foram observados para a amostra total, bem como após a avaliação separada das subamostras. Aa foi detectado com maior frequência em pacientes com periodontite agressiva em relação aos pacientes diagnosticados com periodontite crônica generalizada grave. Após uma análise separada, 15 dos 30 (50%) dos doentes com periodontite agressiva, e apenas 27 dos 83 (33%) pacientes com periodontite crônica foram Aa positiva. No entanto, após análise MT3, 14 das 30 (47%) periodontite agressiva e 36 de 83 pacientes (43%) pacientes com periodontite crônica foram Aa positiva. O estudo permitiu evidenciar que a divisão das amostras de placa subgingival aumentou a contagem bacteriana por uma análise comparada com amostras distintas, e assim, pode aumentar a probabilidade de detecção de patógenos existentes. No entanto, esta observação só foi estatisticamente significativa para a TD. Existe notável variabilidade entre as taxas de detecção em amostras coletadas da mesma bolsa e ao mesmo tempo.

Aimetti, Roman e Nessi (2007) desenvolveram um estudo analisando a microbiologia de bolsas periodontais e de placas ateromatosas de carótida em pacientes com periodontite crônica. Neste estudo foi avaliada a presença de cinco patógenos periodontais: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*

(anteriormente *Tannerella forsythensis*) tanto em bolsas subgengivais quanto em placas ateromatosas. Selecionaram 33 pacientes brancos (12 mulheres e 21 homens) com periodontite crônica avançada, com idades entre 57-68 anos (média de 63 anos) entre Janeiro e Fevereiro de 2005 no Hospital Mauriziano no Departamento de Cirurgia Vascular; estes pacientes estavam com indicação para estenose carotídea exigindo endarterectomia. Pacientes com doenças sistêmicas, submetidos à terapia antibacteriana ou tratamento periodontal nos últimos 6 meses e que não possuíssem um número mínimo de 12 dentes foram excluídos do estudo. Um completo exame periodontal, foi realizado por um único examinador com uma sonda Williams, no mesmo dia da intervenção cirúrgica. A avaliação clínica contou com a verificação do índice de placa, sangramento a sondagem, profundidade de sondagem (PD), e níveis de inserção clínica (CAL) em seis sítios para cada dente em todos os dentes presentes. Os sítios com profundidades ≥ 6 mm, e sangramento a sondagem foram selecionados para cederem à amostra subgengival. Tais amostras foram coletadas com pontas de papel estéreis inseridas nas bolsas selecionadas por 10 segundos e transferidas imediatamente para Eppendorfs contendo 1ml da solução de Ringer. As amostras de placa ateromatosa da carótida foram colhidas durante a endarterectomia e todo o espécime foi colocado em um frasco contendo 10 ml de solução salina estéril, isento de contaminação anterior por DNA, e armazenadas a -20 C. Os resultados obtidos demonstraram que todas as amostras de placa subgengival foram positivas para pelo menos um microorganismo alvo. A prevalência de *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* foram 69,7%, 63,6%, 54,5%, 45,4% e 33,3%, respectivamente. DNA bacteriano foi detectado em 31 das 33 amostras de placas de ateroma. No entanto nenhuma das amostras testadas foi positiva para DNA de patógenos periodontais. São poucos os estudos comparativos entre microbiologia e quadro clínico envolvendo doença periodontal e placas ateromatosas. Neste estudo, a presença de bactérias periodontais em placas ateromatosas não foi confirmada, portanto não pode ser traçada correlação entre bactérias periodontais e microorganismos envolvidos nas lesões de aterosclerose.

Van Winkelhoff, Rijnsburger e Van der Velden (2008) verificaram a estabilidade clonal da *Porphyromonas gingivalis* em uma população de indivíduos da Indonésia privados de prevenção e tratamentos odontológicos e portadores de

diferentes graus de periodontite crônica. Esta análise foi realizada de 1994 (158 pacientes) a 2002 (123 indivíduos). Neste período de 8 anos a *P.gingivalis* tem sido isolada em diferentes momentos da periodontite sem estes pacientes terem recebido tratamentos e terapias periodontais. Os sítios com maiores profundidades de sondagem, sangramento e maiores níveis de perda de inserção clínica em cada quadrante foram selecionados para amostragem. Duas pontas de papel estéreis foram inseridas nos sítios pré-selecionados, e após coleta da amostra esta foi imediatamente cultivada e analisada para detecção da presença e níveis de *P.gingivalis*. Os resultados demonstraram que 66 indivíduos foram positivos para a cultura de *P.gingivalis* em ambos os momentos. Ainda obtiveram que em 31 indivíduos (47%) uma distribuição exata do genótipo idêntico da *P. gingivalis* foi encontrada em 1994 e 2002. Em 26 desses indivíduos um genótipo, e em 8 indivíduos dois genótipos idênticos foram encontrados em ambos os momentos. Em 70% dos indivíduos pelo menos um genótipo da *P. gingivalis* foi detectado em 1994 e 2002, ao passo que outros genótipos foram recentemente descobertos ou não foram mais detectáveis. Estabilidade clonal em irmão foi 39% e a transmissão horizontal de *P.gingivalis* foi encontrada apenas em 2002 e foi baixa (11%). No total 56 genótipos *P. gingivalis* foram identificados em 1994 e 61 em 2002. Vinte e quatro apareceram uma única vez, ao passo que outros genótipos foram encontrados em múltiplos pacientes. A partir deste trabalho concluiu-se que a estabilidade clonal de *P.gingivalis* em condições naturais é alta. Completa distribuição de genótipos diferentes foi encontrada apenas em 27% dos indivíduos e a transmissão de *P.gingivalis* ocorreu frequentemente entre irmãos, mas não entre cônjuges.

Mineoka et al. (2008) executaram um estudo com o objetivo de examinar as relações entre *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, e *Tannerella forsythia* (anteriormente *T. forsythensis*), no biofilme subgengival e o relacionamento entre a quantidade e a prevalência destas três bactérias e a relação saúde periodontal. A população deste estudo consistiu de 35 pacientes adultos (15 homens e 20 mulheres) portadores de periodontite crônica com média de idade de 59,2 anos e com número médio de dentes de 24,8. Foram excluídos pacientes que apresentavam doenças sistêmicas, gestantes e aqueles que submeteram-se a terapia periodontal nos últimos 3 meses. Estes pacientes foram examinados clinicamente, sempre por apenas um mesmo dentista, onde era avaliada

profundidade de bolsa (PD) ≥ 4 mm e sangramento a sondagem (BOP). Esta informação foi utilizada para classificar cada amostra em um dos quatro grupos, dependendo da presença (+) ou ausência (-) de PD ≥ 4 mm e BOP (+ DP / + BOP; -PD / + BOP; DP + /-BOP e -PD/-BOP). As amostras de placas subgengival foram coletadas aleatoriamente em sítios com maiores profundidade de sondagem (PD) em cada sextante, inserindo uma ponta de papel estéril por 10 segundos. Estas pontas de papel foram inseridas em 200 ml de solução tampão para extração de ácidos nucléicos. O DNA genômico das bactérias contidas nas amostras de placas subgengivais foi isolado e purificado utilizando um kit ácido nucléico para extração, de acordo com o protocolo do fabricante e foi utilizado um modelo convencional para a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo real. As amostras subgengivais analisadas neste estudo foram escolhidas aleatoriamente a partir de 210 amostras de placas coletadas de 35 indivíduos e constou de 105 amostras, incluindo duas para cada quatro amostras de cada paciente. Para interpretar os resultados as amostras de placas foram divididas em quatro grupos baseados na presença ou ausência de bolsa periodontal (PD ≥ 4 mm) e sangramento á sondagem (BOP). As proporções de todas as três bactérias detectadas em amostras provenientes de sítios com doença periodontal (com PD e BOP) foram significativamente mais elevadas do que aqueles em outros grupos amostrais. O número de células de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* nas amostras de placa subgengival de cada sítio foram significativamente correlacionadas entre si e foram maiores nas placas provenientes de sítios com doença periodontal (PD ≥ 4 mm e BOP).

Perez-Chaparro et al. (2008) investigaram a relação clonal entre *Porphyromonas gingivalis* isoladas de amostras de sangue e de placa subgengival em pacientes com bacteremia positiva transitória para periodontite. Foram incluídos no estudo 16 pacientes diagnosticados com periodontite crônica (10/16) ou periodontite agressiva (6/16) generalizadas. Estes indivíduos deveriam possuir pelo menos 10 bolsas subgengivais ≥ 7 mm e necessitando cirurgia periodontal após raspagem, alisamento e polimento radicular (RAP). O exame periodontal incluiu tomadas radiográficas de todos os pacientes, avaliação de profundidade de bolsa, nível de inserção clínica e sangramento a sondagem. Todos estes pacientes foram positivos para *P. gingivalis* em amostras de placa subgengival colhidas antes da RAP. Foram

coletadas amostras de sangue e placa subgengival para análise. A placa subgengival foi obtida de seis bolsas ($\geq 7\text{mm}$), e no dia da cirurgia uma segunda amostra foi colhida antes do procedimento de RAP. O tempo entre a retirada da primeira e segunda amostra variou entre 1-4 semanas. Estas amostras subgengivais foram colhidas por meio de pontas de papel estéreis. Quatro amostras de sangue foram coletadas a partir da veia ante cubital nos seguintes momentos: H1-antes do procedimento de RAP; H2- imediatamente após o término do procedimento; H3- 15 minutos após o procedimento; H4- 30 minutos após o final do procedimento. Rap foi avaliado durante o 10º minuto (10 sítios, 1 minuto por sítio). Instruíram a todos os pacientes a não tomarem o café da manhã ou escovar os dentes antes do procedimento para evitar outra fonte de bacteremia diferente da RAP. Os seguintes testes foram realizados para identificar e confirmar positivamente as espécies de *P.gingivalis*: morfologia de colônia (carbobenzoxy-L-arginina-7-amino-4-methylcoumarin, Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.), o comercialmente disponível sistema ID-32^a (bioMerieux, Lyon, França) e através da Reação da Polimerase em Cadeia utilizando oligonucleotídeos 16s RNA base. Após realizados estes exames as amostras colhidas após RAP de 16 pacientes, apresentaram bacteremia positiva de *P.gingivalis* para 7 pacientes e 9 foram negativos. Trinta e duas cepas foram isoladas a partir da placa subgengival e de amostras de sangue antes e durante a bacteremia transiente induzida e a maioria dos pacientes abrigava um tipo clonal. Dois pacientes apresentaram diferentes clones em placas e amostras de sangue o que sugere que mais de um clone pode ser encontrado na placa subgengival. *P.gingivalis* isoladas de pacientes com periodontite após bacteremia transitória imediata a RAP revelou uma grande heterogeneidade entre os isolados. Em 6 dos 16 indivíduos examinados as mesmas *P.gingivalis* isoladas foram encontradas no sangue e na cavidade oral. A heterogeneidade da *P.gingivalis* não sugere nenhuma associação com um único tipo clônico de bacteremia passageira.

Kulecki et al (2008) desenvolveram um estudo para avaliar a prevalência de *Actinobacillus Aggregatibacter*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola* na saliva de crianças com dentição mista e gengiva saudável. Utilizaram 41 crianças (22 meninos e 19 meninas), entre 6 e 13 anos de idade que tiveram a salivação estimulada por parafina através de um chiclete sem açúcar que mascaram por 2 minutos e

expectoraram em um tubo estéril, sendo obtidas as amostras. Para critério de inclusão as crianças deveriam conter pelo um dos primeiros molares e incisivos permanentes e ainda molares decíduos, presença de saúde gengival com profundidade de sondagem de até 3mm. As bactérias testadas foram identificadas através da análise pela Reação da Polimerase em Cadeia utilizando a 16rRNA como base. Os resultados demonstraram uma prevalência da espécie *P. nigrescens* (80%), seguida por *T.denticola* (32%), *A.actinomycescomitans* (24%), e *P.gingivalis* (12%). *P.intermedia* e *T.forsythia* não foram detectadas. *P.nigrescens* também se mostrou comum em combinações de espécies. Combinações de duas bactérias e associações de três bactérias foram encontradas em 24% e 20% de todas as crianças, respectivamente. Com este experimento concluíram que a presença na saliva de *P.nigrescens*, *T.denticola*, *A.actinomycescomitans* e *P. gingivalis*, mas não *P.intermedia* e *T.forsythia* podem ocorrer na infância, sem sinais clínicos da doença gengival. Assim, o possível risco de transmissão bacteriana através da saliva e, a necessidade de proteção para patógenos periodontais devem ser considerados antes de dentição mista.

Ready et al. (2009) realizaram um estudo utilizando o método da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) múltiplo para detectar três patógenos periodontais em placa subgengival coletada antes e em 2 e 6 meses após o tratamento. Foram incluídos no estudo 107 indivíduos portadores de periodontite crônica e excluídos os portadores de doenças sistêmicas, gestantes ou lactantes e os que receberam terapia antibiótica ou periodontal nos últimos 3 meses. O exame clínico periodontal foi realizado sempre por um mesmo Periodontista calibrado e contou com a análise de índice de placa, sangramento a sondagem, profundidade de bolsa (PPD), número de bolsas ≥ 5 mm e níveis de inserção clínica. As amostras subgengivais foram recolhidas das quatro bolsas periodontais mais profundas, sendo uma de cada quadrante por meio de curetas estéreis e em seguida armazenadas em líquido de extração e transporte de DNA. As bactérias investigadas foram *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivallis* e *Actinomyces actinomycescomitans*. A terapia periodontal não cirúrgica resultou em uma significativa melhora em todos os parâmetros clínicos periodontais analisados nos 2 e 6 meses pós-terapia. A média de redução de bolsas periodontais ≥ 5 mm foi obtida junto com a redução na média de profundidade a sondagem, sangramento e níveis de placa nos 2 e 6 meses pós

terapia comparados aos índices pré tratamento. A proporção dos pacientes que armazenavam os patógenos pré tratamento foram: *Tannerella forsythia* 81%, *Porphyromonas gingivallis* 78% e *Actinomyces actinomycetemcomitans* 42%. Nas análises bacteriológicas de 2 meses pós terapia encontraram uma significativa redução no número de pacientes portadores destas bactérias, tal como: *P.gingivalis* (46%), *T.forsythia* (63%) mas não o *A. actinomycetemcomitans* (50%) que demonstrou um relativo aumento. Na análise de 6 meses pós tratamento, menos pacientes armazenavam *P. gingivalis* (43%), *A. actinomycetemcomitans* (31%) e *T.forsythia* (63%). As análises iniciais e de 2 meses pós terapia evidenciaram que pacientes que portavam apenas um patógeno demonstravam um quadro de doença periodontal mais avançado do que pacientes que possuíam dois ou três destes patógenos. Estes dados sugerem que a redução no numero de espécies presentes pode estar associado com um aumento na severidade da doença periodontal.

2.2—Terapia Periodontal Mecânica: Raspagem, Alisamento e Polimento Radicular (RAP)

Axtelius et al. (1997) realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar os critérios clínicos para a classificação de 2 de diferentes grupos de pacientes. Estes pacientes foram selecionados do Departamento de Periodontia no Centro de Ciências da Saúde Oral da Universidade de Lund, Malmo, entre os anos 1979-1993 e portadores de diferentes graus de doença periodontal. Foram selecionados 22 pacientes, com idades entre 35-55 anos, e todos submetidos a tratamento periodontal por cirurgiões dentistas especialistas em Periodontia. Cada grupo contava com 11 pacientes e foram divididos em: grupo respondendo bem ao tratamento periodontal (grupo responsivo -R) e o outro grupo foi classificado como não respondendo bem ao tratamento (grupo não responsivo-NR). Examinaram a profundidade de sondagem em todos os pacientes, e selecionou os com profundidades ≥ 6 mm medidas em quatro superfícies de cada dente durante o tratamento, observaram ainda mobilidade dentária e frequência de placa. Os tratamentos realizados foram agrupados em: 0- Informação e instrução de higiene oral, 1- Profilaxia profissional com taça de borracha, 2-Raspagem de um único dente, 3- Raspagem de um quadrante, 4- Raspagem de dois quadrantes, 5-

Raspagem de três quadrantes e 6-Raspagem de quatro quadrantes. Uma avaliação da frequência dos procedimentos foi feita e também foram registradas as seguintes variáveis: número de dentes antes e após o tratamento, número de tratamentos por mês, duração do tratamento, número de extrações durante o tratamento, e dentes perdidos por ano. Os dois grupos de pacientes receberam tratamento a cada 2-3 meses para uma média de 5-6 anos de acompanhamento. Os resultados comparativos entre os dois grupos (R e NR) antes e após a terapia mecânica evidenciam uma melhoria altamente significativa nas profundidades de bolsa $\geq 6\text{mm}$ e mobilidade, sendo que na avaliação inicial de ambos os grupos foram bastante homogêneos em relação aos sinais da doença periodontal.

Haffajee et al. (1997) executaram um estudo cujo objetivo era procurar diferenças clínicas e microbiológicas entre indivíduos que responderam bem ou mal a Raspagem e Alisamento Radicular (RAP). Foram selecionados 57 indivíduos com idade entre 23-71 anos, com mínimo de 20 dentes, com perda previa de inserção e pelo menos 8 sítios com bolsas $>4\text{mm}$ de profundidade e ou 8 sítios com perda de inserção $>3\text{mm}$. Gravidez, terapia periodontal previa e ou antibiótico nos últimos 3 meses e doenças sistêmicas foram critérios de exclusão. Todos os pacientes foram examinados antes do tratamento e 3 meses após tratamento. Índice de placa, gengivite, sangramento a sondagem, supuração, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica foram analisadas em 6 sítios de cada dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual e distolingual). Todas as medições foram realizadas por um mesmo clínico, o qual não participou dos procedimentos de terapia radicular. O tratamento consistiu de raspagem e aplainamento radicular, sendo um quadrante tratado semanalmente sob anestesia local, de modo que o tratamento foi concluído em 1 mês. Os pacientes também foram instruídos sobre formas de manterem a higienização oral domiciliar. Foram colhidas amostras de placa subgengival utilizando curetas *Gracey* na face mesial de cada dente, na consulta inicial e 3 meses pós terapia. Promoveram contagens de 40 espécies subgengival em cada amostra de placa através da técnica de hibridização DNA-DNA. Os resultados clínicos foram avaliados e os indivíduos foram enquadrados em 2 grupos com base nestes resultados. 39 indivíduos apresentaram aumento de inserção clínica pós tratamento e foram designados como Grupo Responsivo (GR), enquanto 18 indivíduos demonstraram perda de inserção clínica

pós tratamento e foram classificados como Grupo Não Responsivo (GNR). O grupo responsivo demonstrou um maior ganho de inserção nos sítios com profundidade inicial <4mm, 4-6mm e >6mm, com melhora mais acentuada nos sítios mais profundos, do que os indivíduos do grupo não responsivo. Pacientes do grupo não responsivo com profundidade de bolsa inicial <4mm, demonstraram perda de inserção após terapia. E nas bolsas com profundidades moderadas a grave, o ganho de inserção foi menos pronunciado do que no grupo responsivo nestes mesmos sítios. Não houve diferenças significativas entre os 2 grupos em porcentagem nos sítios exibindo placa, gengivite, sangramento a sondagem e supuração. Em relação as bactérias estudadas, as análises demonstraram em ambos os grupos, que as únicas espécies que foram significativamente reduzidas como resultado da terapia radicular foram: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Bacteroides forsythensis* (*T.forsythia*) e os sítios que apresentaram taxas reduzidas destas bactérias aumentaram em ≥ 2 mm os níveis de inserção pós operatória. Os dados deste estudo indicam que a terapia mecânica é mais eficaz em indivíduos e sítios com níveis elevados de espécies subgengivais que esta terapia afeta.

Takamatsu et al. (1999) realizaram um estudo para observar o efeito da terapia periodontal inicial na frequência de detecção de *Bacteroides forsythus* (*T.forsythia*), *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Para este estudo selecionaram 26 pacientes, sendo 10 homens e 16 mulheres com idades variando de 16 a 61 anos. Destes pacientes, 11 foram diagnosticados com periodontite crônica e 15 com periodontite precoce. O critério de seleção foi a presença de uma bolsa com profundidade de sondagem ≥ 6 mm, sem tratamento periodontal prévio nos últimos 6 meses, e sem terapia antimicrobiana nos últimos 3 meses. Duas semanas antes da terapia, a profundidade de sondagem foi executada em seis sítios por dente. Um total de 104 sítios de cada quadrante foi selecionado. Um mês antes da terapia periodontal inicial, também foram avaliados critérios clínicos como sangramento à sondagem após mensuração de profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. O tratamento periodontal consistiu de instrução de higiene oral e uma meticulosa raspagem e alisamento periodontal. A coleta das amostras foi executada após remoção da placa supragengival, com cones de papel estéreis inseridos nas bolsas periodontais por 30 segundos e então armazenados em tubos Eppendorf e analisados através da Sonda de DNA através

do test Kit para *T.forsythia*, e *P.gingivalis*. Para avaliação da *A.actinomycetemcomitans* também utilizou se o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As médias de parâmetros clínicos foram analisadas através do Teste de Wilcoxon e também para as frequências de bactérias. Os resultados demonstraram que as médias iniciais de profundidade de sondagem de 5.6mm foram reduzidas para 3.9 mm após terapia. Os níveis de inserção clínica de 5.3mm reduziram para 4.6mm após terapia com análise estatisticamente significativa. Os índices de sangramento a sondagem inicial eram de 76% dos sítios sondados, e após o tratamento periodontal reduziram para 51.9%. Os resultados bacterianos pela sonda de DNA demonstraram que *T.forsythia* foi o patógeno mais prevalente nas análises iniciais (todos os pacientes em um total de 77.9% dos sítios) e após a terapia (65.4% dos pacientes em 35.6 % dos sitios). *P.gingivalis* foi detectada em 65.4% dos sítios examinados pré-terapia e em 22.1% dos sítios examinados pós - terapia. *A.actynomicetemcomitans* foi identificada pela sonda de DNA em 1.9 % dos sítios inicialmente, enquanto que pela técnica do PCR foi encontrada em 16.4% inicialmente e 8.7% após terapia. A frequência dos sítios armazenando *T. forsythia* e *P. gingivalis* foram significativamente reduzidos após a terapia periodontal. Embora com *A.actynomicetemcomitans* os valores encontrados por sonda de DNA e PCR pós terapia não foram estatisticamente significantes. Concluíram com este estudo que *P.gingivalis* e *T.forsythia* podem ser reduzidos e ou eliminados com a terapia inicial, mas não *A.actynomicetemcomitans*. Quando os níveis destas bactérias diminuíram, os parâmetros clínicos apresentaram melhoria significativa.

Chaves et al. (2000) promoveram um estudo cujo objetivo era verificar a colonização bacteriana persistente de *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) em periodontite e a associação destas com perda óssea alveolar após 6 meses de terapia. Neste estudo foram incluídos 40 pacientes com idade entre 30 a 70 anos (média de 47,5 anos), sendo 15 homens e 25 mulheres distribuídos segundo suas raças em 24 brancos, 12 afro americanos e 4 asiáticos. Um paciente foi excluído do estudo, sendo então a amostragem de 39 pacientes. Todos em bom estado de saúde geral, e que haviam sido previamente diagnosticados e tratados para periodontite do adulto nos últimos 2 anos, mas que ainda apresentavam de 2 a 6 dentes com bolsas subgingivais com profundidade de sondagem ≥ 5 mm. Estes sítios apresentavam

também perda de altura óssea superior a 0,5mm em 2 radiografias clínicas a partir do mesmo local, nos últimos 2 anos, medidas a partir da junção cimento esmalte. Todos os indivíduos possuíam o mínimo de 20 dentes, exceto terceiros molares. Estes não haviam recebido terapia antibiótica periodontal nos últimos 3 meses. Eram excluídos indivíduos com história de alergia as tetraciclinas, diabetes, doença cardíaca, febre reumática ou em uso de imunossupressores. Durante o estudo, 2 de cada 4 sítios testados em cada paciente foram monitorados ao longo de um período de 6 meses. Estes sítios foram preferencialmente os com profundidade ≥ 6 mm e com sangramento a sondagem. Foram registradas medidas clínicas tais como profundidade de bolsas, perda de inserção clínica, sangramento a sondagem e avaliação da placa supragengival e recolheu-se amostras de placa subgengival em 1,3 e 6 meses após tratamento. Foram também obtidas radiografias padronizadas nos períodos pré tratamento e 6 meses pós tratamento. Para o tratamento periodontal todos os indivíduos receberam instruções de higiene oral, profilaxia de boca toda e raspagem e aplainamento radicular com anestesia local em todos os dentes. Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente para receberem tratamentos antibióticos adjuvantes com Doxiciclina (200mg no 1º dia e 100mg durante 21 dias) ou não receberam nenhum antibiótico após a terapia radicular. A raspagem subgengival foi executada em todos os indivíduos novamente após 3 e 6 meses do tratamento inicial. As amostras de placa subgengival foram coletadas utilizando pontas de papel estéreis inseridas nas áreas mais profundas das bolsas durante 10 segundos, imediatamente retirados e colocados em tubos e analisados no mesmo dia através do teste ELISA modificado. Os resultados demonstraram que a presença de *P.gingivalis* na placa após o tratamento foi significativamente associada com perda óssea progressiva. Em contraste, a presença de *P.intermedia* encontrada em placa após o tratamento não foi indicativa de perda óssea progressiva. O número de sítios colonizados por *P.gingivalis* ou *P.intermedia* foi reduzido em um mês após o tratamento. Aos 3 meses, ocorreu a recolonização de alguns sítios por *P.gingivalis* e *P.intermedia*, e os números continuaram a aumentar em 6 meses. Aos 6 meses, o teste positivo de prevalência de *P.intermedia* nos sítios aproximou-se do visto no início do estudo. Em pouquíssimos sítios tinham provas de *A.actinomycetemcomitans* para serem significativos a análise estatística. Diferenças não significativas de perda óssea foram atribuídas a antibioticoterapia sistêmica.

Esses dados indicam que, nesta população, a presença de *P. gingivalis* na placa após o tratamento pode ser indicativo da perda óssea alveolar progressiva.

Doung-udomdacha et al. (2001) realizaram um estudo cujo objetivo foi relacionar o número de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* com os parâmetros clínicos em sítios doentes e saudáveis de pacientes analisados antes e após a terapia periodontal não cirúrgica utilizando o método sensível quantitativo da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Analisaram 50 pacientes com média de idade de 47 anos, portadores de periodontite crônica, sendo 21 destes fumantes. Vinte destes pacientes eram tratados periodontalmente pela primeira vez e os outros trinta pacientes eram tratados não cirurgicamente e necessitavam de nova terapia. Foram analisados 541 sítios destes pacientes e os sítios doadores foram padronizados da seguinte forma: Sítios saudáveis foram os de profundidade de bolsa < 3mm sem sangramento gengival a sondagem, e sítios doentes foram os com profundidade de bolsa > 3mm. Sítios sem tratamento ou pré tratamento refere-se a amostras obtidas a partir de locais sem tratamento, embora outros quadrantes do mesmo paciente podem ter sido tratados e pós tratamento remete as amostras de sítios que já tinham recebido tratamento. Amostras de placa subgengival foram tomadas de cada paciente pré tratamento (após a avaliação inicial) e, em seguida, em 2 semanas e 4-6 semanas após o início do tratamento, bem como em 3 e 6 meses após a conclusão do tratamento. Amostras de 3 a 4 sítios por pacientes foram selecionadas, para que pelo menos uma de cada tivesse uma profundidade de sondagem periodontal entre 3mm, 3-5mm, e >5mm. Os mesmos sítios em cada paciente foram analisados em cada ocasião. As amostras foram retiradas subgengivalmente com curetas estéreis inseridas na base de cada bolsa periodontal e então dispersas em 700 ml de redução do fluido de transporte, e submetidas ao método de processamento para PCR. Foram realizadas medições clínicas como: Profundidade de bolsa (a partir da margem gengival a base da bolsa), perda de inserção clínica (a partir da junção cimento esmalte a base da bolsa) e presença de sangramento a sondagem (sim ou não). Todas as medidas clínicas foram realizadas utilizando uma Sonda de Williams convencional. Estas medições foram registradas antes, durante e após a conclusão do tratamento não cirúrgico e nas visitas de revisão. Estas medições foram realizadas em seis sítios em cada dente (vestibular, méso vestibular, disto vestibular,

lingual, disto lingual e méso lingual), e foram executadas por seis clínicos diferentes previamente calibrados de forma padronizada. O tratamento periodontal consistiu de instruções de controle de placa e higiene oral a todos os indivíduos, bem como raspagem dos sítios com profundidade superior ou igual a 4mm. Anestesia local foi empregada, sempre que necessária. O regime de tratamento foi concluído dentro de 2-3 meses e cada paciente foi reavaliado 3/6 meses após tratamento. Outros tratamentos não cirúrgicos foram realizados após 3 meses em sítios que não tinham respondido a terapia inicial e da mesma forma, novas instruções de higiene oral foram fornecidas. Os resultados da quantificação das bactérias revelaram que as contagens de *P.gingivalis* foram associadas com profundidade de bolsa e perda de inserção, entretanto, nem *P.intermedia* e *A.actinomycescomitans* foram associadas com os sinais clínicos examinados. Após o tratamento houve uma diminuição significativa do número de todas as três espécies em ambos os sítios saudáveis e doentes (86-99%), mas nenhuma espécie foi erradicada. Associações positivas foram encontradas entre quaisquer duas das três espécies estudadas tanto em pré e pós-terapia. Através das visitas de acompanhamento, houve uma melhoria significativa na profundidade de sondagem, mas tais melhorias não ocorreram em outros parâmetros clínicos. Este estudo demonstrou a utilidade do PCR quantitativo para a enumeração de patógenos periodontais putativos de espécimes clínicos e que o número dos três microorganismos em todos os sítios diminuíram com a terapia periodontal não cirúrgica, comprovando a eficácia desta.

Hung e Douglass (2002) realizaram um estudo meta-analítico dos efeitos de raspagem e alisamento radicular, tratamentos cirúrgicos e terapia antibiótica em profundidade de sondagem e perda de inserção clínica. Uma meta-análise é uma análise estatística que combina os resultados de vários estudos para proporcionar maior poder de identificação quantitativas de tendências. A fim de proporcionar um melhor e mais completo entendimento, raspagem e escamação é primeiramente analisado independentemente e, em seguida, em comparação com tratamento cirúrgico e com farmacoterapia. Assim, a presente meta-análise é apresentada em três partes: I- Evidências relacionadas com a redução da profundidade de sondagem periodontal e ganho de inserção clínica após raspagem e alisamento radicular. II- Evidências relacionadas com a redução de profundidade de sondagem periodontal e ganho de inserção clínica após raspagem e alisamento radicular, comparados com

tratamento cirúrgico (Técnica do retalho de Widman modificado). III- Evidências relacionadas com o efeito de raspagem e alisamento radicular quando em comparação com ou combinado com o efeito do tratamento com terapia antibiótica em três locais específicos. Para as análises do Grupo I, o estudo focou em que a raspagem e alisamento radicular foram sozinhos um dos principais braços do tratamento com 80% dos pacientes sendo acompanhados no primeiro ano do estudo, o paciente e ou o quadrante tratado de cada paciente foi padronizado randomicamente. Devido a diferenças substanciais na profundidade de sondagem inicial elegíveis em todos os estudos, a associação entre profundidade de sondagem inicial e efeito do tratamento foi testada utilizando um modelo de regressão após o ajuste para o tempo de seguimento e ponderação pelo numero de indivíduos em cada estudo. Uma medição do resultado dos efeitos do tratamento foi escolhida a partir de estudos que estavam mais próximos aos 2 anos de acompanhamento. Uma associação significativa foi encontrada entre profundidade de sondagem inicial e redução da profundidade periodontal e ganho de inserção clínica. A maioria dos estudos estratificavam as sondagens iniciais em: profundidade rasa (1 a 3mm), media (4 a 6mm) e profunda (>7mm). Estes dados demonstraram que raspar e aplainar raízes em bolsas inicialmente rasas demonstrou reduções em profundidade de sondagem de 0,15 a 0,62mm; para bolsas inicialmente médias as reduções foram de 0,40- 1,70mm e bolsas de profundidade inicial altas, as reduções foram de 0,99- 2,80 mm. Para ganho de inserção clínica, raspagem e alisamento radicular resultaram em um ganho de 0,50 – 0,29mm para bolsas rasas, 0,10-1,09mm para bolsas médias e 0,32- 2,00mm em bolsas inicialmente profundas. A meta análise verificou também pacientes tratados cirurgicamente (Retalho de Widman Modificado) e tratados não cirurgicamente (raspagem e alisamento radicular) e pacientes tratados localmente com aplicações antibióticas, incluindo Tetraciclina, Metronidazol e Minociclina e estes pacientes também foram acompanhados por um período mínimo maior que 6 meses. Os resultados destas três análises demonstraram que profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica não melhoram significativamente após raspagem e alisamento em pacientes com bolsa periodontal inicial rasa. Contudo, houve cerca de 1mm de redução para bolsas com profundidade inicial média e uma redução de 2mm para bolsa inicialmente profundas. Do mesmo modo o ganho de inserção clínica foi de cerca de 0,50mm em

perda média inicial pequena e de cerca de 1mm em níveis de inserção mais profundos. A terapia cirúrgica para pacientes com profundidade inicial elevada mostraram resultados melhores do que raspagem e alisamento na redução de profundidade de sondagem. Quando os pacientes foram acompanhados por 3 anos ou mais estas diferenças foram reduzidas para menos de 0,4mm. Os estudos com terapia antibiótica mostraram resultados similares para raspagem e alisamento. No entanto, uma melhoria significativamente consistente foi observada em profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica demonstrado nas análises quando cirurgia local é combinada com terapia antibiótica e raspagem.

Kenny et al. (2003) realizaram um estudo cujo objetivo foi comparar as respostas clínicas em 12 meses de tratamento periodontal mecânico em pacientes Chineses com periodontite crônica em sítios com e sem a presença inicial de *Actinobacillus actynomicetemcomitans* e investigar a efetividade do tratamento periodontal mecânico em eliminar o *A. actynomicetemcomitans*. Selecionou-se 19 pacientes sendo 12 homens e 7 mulheres, com idades entre 30 e 51 anos (média de 42,8 anos), que não possuíam doenças sistêmicas preexistentes, não foram submetidos a terapia mecânica ou antibiótica nos últimos 6 meses, não gestantes ou lactantes e com presença de bolsas em um dente de cada quadrante com profundidade (PD) ≥ 5 mm. Todos os dados clínicos e microbiológicos foram executados por um único examinador calibrado, enquanto que a terapia mecânica e manutenção seguindo os protocolos foram realizadas por outros dois operadores que desconheciam os locais utilizados para amostragem. Todos os dentes foram sondados em seis sítios (mesio vestibular, vestibular, disto vestibular, mesio lingual, lingual e disto lingual) usando uma sonda manual, e foram registrados dados como: presença ou ausência de placa subgengival (PI%), sangramento a sondagem (BOP), profundidade de sondagem (PD), nível de inserção clínica (PAL), usando um guia oclusal de acrílico como referência. Mudanças em PAL e recessão (REC) foram calculadas usando as medições de PAL e PD inicialmente, e em 3,9 e 12 meses. A fase de terapia mecânica contou com instruções de higiene oral e remoção de placas supragengivais nas consultas iniciais. Instrumentação subgengival foi executada sob anestesia infiltrativa papilar em consultas de 45 minutos durante 2-3 semanas. Estes pacientes retornavam após 3 meses para novas instruções de higiene oral e os que possuíam bolsas ≤ 5 mm foram novamente tratados

supragengivalmente, enquanto os que possuíam PD ≥ 6 mm em bolsas persistentes foram tratados cirurgicamente. Após 9 e 12 meses estes pacientes retornavam e novas mensurações eram executadas. As coletas de amostras de placas subgengivais foram executadas através de três pontas de papel estéreis inseridas por 10 segundos nas bolsas mais profundas de cada quadrante. Estas amostras foram para tubos contendo 2 ml de fluido estéril reduzido de transporte e imediatamente transportado até o laboratório para processamento. As amostras foram diluídas e inoculadas em soro de bacitracina-vancomicina Agar e incubadas em dióxido de carbono a 5% por 5 dias. As colônias de *A. actinomycetemcomitans* foram identificadas de acordo com seu formato de estrela e aspecto cremoso amarelado usando um microscópio óptico para esta dissecação. Estas amostras foram coletadas, além de inicialmente, também com 3 e 12 meses após terapia. Os resultados evidenciaram que inicialmente a *A. actinomycetemcomitans* foi detectada em 13 dos 19 pacientes (68%) e em 29 dos 52 sítios foram positivos para *A. actinomycetemcomitans* (56%). O *A. actinomycetemcomitans* não foi encontrado em amostras de sítios de seis pacientes. Após 3 meses da terapia mecânica não cirúrgica o *A. actinomycetemcomitans* não foi identificado em 5 dos sítios originalmente positivos para esta bactéria, e no fim dos 12 meses, três dos sítios originalmente positivos para *A. actinomycetemcomitans*, ele não foi identificado, enquanto em apenas um paciente que o *A. actinomycetemcomitans* não havia sido inicialmente identificado, ele foi encontrado no final dos 12 meses. Os modelos de análises de multi variância demonstraram que não foi estatisticamente significativa a diferença entre todos os parâmetros clínicos entre pacientes *A. actinomycetemcomitans* positivos e negativos. Nos sítios inicialmente positivos para *A. actinomycetemcomitans*, a média de profundidade de sondagem (PD) foi reduzida de 7.6mm \pm 1.6mm para 3.2 mm \pm 1.8mm, e a média de ganho de inserção clínica (PAL) foi de 1.4 \pm 2.0mm e a média de recessão foi de 3.0 \pm 2.3mm. Concluíram que respostas clínicas favoráveis após terapia mecânica ocorreu em pacientes chineses com periodontite crônica em sítios infectados com *A. actinomycetemcomitans*. A mera detecção de *A. actinomycetemcomitans* subgengival não implica necessariamente como resultados de um tratamento inferior para os pacientes com periodontite crônica.

Cadosch et al. (2003) realizaram um estudo relacionando as associações entre o número de raspagens radiculares padronizadas e o nível de redução das endotoxinas sobre as superfícies radiculares. Foi feito um estudo *in vitro* em 24 dentes humanos extraídos, livres de cáries e com uma única raiz, e com pelo menos 5mm de perda de inserção devido à periodontite crônica. A região de interesse (ROI) contendo cálculo subgingival na superfície interproximal da raiz de cada dente. Dentes com cáries e ou tratados endodonticamente foram excluídos. Estes dentes após extraídos eram imediatamente colocados em tubo de ensaio contendo água natural e armazenados por até 2 semanas a 4°C. Foi aplicada uma instrumentação utilizando uma cureta com força vigorosa padronizada, e ativada por um dispositivo paralelo, convertendo-se milivolt em newtons (N) e registrando-se as forças aplicadas a cada dente. Utilizou-se cinquenta pacientes que sofreram acidente vascular cerebral, avaliando-se a presença de cálculo através dos detritos obtidos com a raspagem e avaliou-se os níveis de concentração de endotoxina nestes raspados. Utilizaram-se protocolos padronizados para mensuração das concentrações de toxinas através do Limulus amoebocyte Lysate (LAL-Coatest®). Os resultados apontam que nas raspagens terapêuticas de 1/5 estes demonstraram valores estatisticamente mais significativos que em todos os outros tempos de intervalos. As concentrações de endotoxina atingiram valores mínimos de 0,03-0,306 EU/ml após a remoção completa do cálculo. Estes achados permitem concluir que a remoção completa do cálculo coincide com níveis de endotoxina associados com dentes clinicamente saudáveis.

Carvalho et al. (2005) realizaram um estudo em que observaram raspagem e alisamento radicular, uso de metronidazol sistêmico e remoção de placa profissional no tratamento de uma população brasileira com periodontite crônica e seus resultados microbiológicos. Este estudo comparou 39 espécies bacterianas em amostras de placas subgingivais após a raspagem e alisamento radicular unicamente ou em combinação com Metronidazol sistêmico e ou comparando com limpeza profissional. O estudo contou com 44 indivíduos adultos com idade média de 45-46 anos, diagnosticados com periodontite, possuindo pelo menos 15 dentes e com no mínimo 8 dentes com um sítio de profundidade de bolsa (PB) e perda de inserção clínica entre 6 e 10mm e três sítios com profundidade de bolsa e perda de inserção clínica menor que 4mm. Utilizaram gravidez, doenças sistêmicas pré

existentes e cobertura antibiótica em procedimentos odontológicos previamente realizados e alérgicos ao Metronidazol como critério de exclusão. Este estudo foi randomizado, duplo cego, e controlado com placebo. Inicialmente todos os pacientes receberam instruções de higiene oral e informações para higienização domiciliar. O tratamento para todos os pacientes envolvidos na pesquisa consistiu de Raspagem e Alisamento radicular de boca inteira sob anestesia local. Esta terapia mecânica foi concluída em no máximo seis faces de cerca de 1 hora cada. O tratamento de toda cavidade oral foi concluído em 14 dias. Posteriormente, os sujeitos foram aleatoriamente agrupados em um dos seguintes grupos terapêuticos: Grupo Controle (C) – Terapia mecânica e placebo; Grupo Teste 1 (T1) – Terapia mecânica e Metronidazol administrado sistemicamente; Grupo Teste 2 (T2)- Terapia mecânica e limpeza profissional semanalmente e placebo; Grupo Teste 3 (T3)- Terapia mecânica, associado a Metronidazol sistêmico e limpeza profissional semanal. Os indivíduos que receberam Metronidazol, foram medicados com 400mg da droga ministrada 3 vezes por dia durante 10 dias. E os indivíduos do grupo placebo, receberam este no mesmo esquema de prescrição da terapia com Metronidazol. As amostras de placa subgingival foram coletadas inicialmente (pré tratamento) e em 90 dias após a terapia, a partir de sete sítios por indivíduo, sendo 4 sítios com profundidade de sondagem e inserção clínica entre 6 e 10mm, e três sítios com profundidade de sondagem e inserção clínica menor que 4mm. Amostras de 39 espécies bacterianas foram analisadas através de amostras de DNA utilizando a técnica de Hibridização do DNA (Socransky et al. 1994). Estas amostras subgingivais eram recolhidas com curetas Gracey estéreis e foram colocadas separadamente em tubos Eppendorf contendo 0,15ml de TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6). 0,15 ml de 0,5M NaOH foi adicionado a cada tubo e as amostras foram dispersas utilizando um misturador vortex e em seguida todo o protocolo da técnica de hibridização do DNA foi executado. Os resultados demonstraram que a contagem média da maioria das espécies foram reduzidas nas amostras dos 4 grupos pós tratamento. Contagens de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram significativamente reduzidos nos grupos T2 e T3. Espécies benéficas, como algumas espécies *Actinomyces*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii* foram afetadas em níveis minimamente significativos quando a terapia combinada foi

aplicada (T3). Proporções de espécies do complexo vermelho diminuíram de 18,4% na amostra inicial para 3% em 90 dias pós terapia no Grupo T3 e de 25,8% para 2,3% no Grupo T2, a partir de 17,7% para 5,6% no Grupo T2 e de 19,4% para 8,8% no Grupo C. Proporções de patógenos periodontais suspeitos do complexo laranja também foram acentuadamente reduzidos nos grupos T2 e T3. Com este estudo verificou se que todos os tratamentos reduziram contagens e proporções das espécies do Complexo Vermelho e que as terapias adjuvantes pareciam ter um efeito maior nas espécies membros do Complexo laranja.

Chambrone e Chambrone (2006) executaram um estudo retrospectivo com o objetivo de avaliar as razões para a perda dentária em uma amostra de pacientes submetidos à terapia periodontal de suporte e a terapêutica periodontal (TSC), na prática privada em clínicas brasileiras. Selecionaram uma amostra de 120 indivíduos (47 homens e 73 mulheres) que foram tratados pelos métodos de raspagem, e alisamento radicular em clínicas privadas de São Paulo. Os critérios de inclusão para a pesquisa foram os seguintes: 1) idade ≥ 20 anos; 2) regime de manutenção de tratamento de 6-12 meses com periodontistas; 3) Terapia periodontal de suporte de pelo menos 10 anos; 4) Diagnosticados com periodontite crônica generalizada. Indivíduos com doenças sistêmicas crônicas, periodontite refrataria ou má higiene oral nos períodos de manutenção da terapia periodontal foram excluídos do estudo. Os níveis clínicos foram tomados no primeiro exame dos pacientes, tais como: profundidade de sondagem medidos em seis faces de cada dente, mobilidade dentária, envolvimento de furca, índice de placa e também medições radiográficas em torno de todos os dentes verificando o nível ósseo do alvéolo. Todos os pacientes seguiram um protocolo de tratamento semelhante: (1) instruções de higiene oral; (2) raspagem e aplainamento radicular; (3) polimento dental; (4) re-avaliação e (5) cirurgia periodontal quando indicado. Cuidados de suporte periodontal foram executados periodicamente e radiografias periapicais individuais foram tomadas quando necessárias. O número e o tipo de dentes perdidos, incluindo os terceiros molares, foram avaliados a partir de registros de dados gravados na maioria dos exames recentes de cada paciente. Durante as consultas de suporte periodontal, as decisões de extrair um dente foram baseadas em condições clínicas e radiográficas. Os motivos de perda dental foram categorizados como envolvimento avançado de furca, aumento de mobilidade, perda

óssea avançada, extensão e gravidade da destruição periodontal, cáries (condições não restauráveis), motivos endodônticos, fraturas de raiz. Dentes perdidos como parte inicial da terapêutica não foram contabilizados como sendo perdidos durante o período de manutenção periodontal. Os resultados demonstraram que dos 2927 dentes presentes na realização do tratamento periodontal ativo, 53 (1,8%) foram perdidos devido a doença periodontal, 16 (0,5%) foram devido a fraturas de raiz, 6(0,2%) devido a Cárie, 5 (0,2%) por razões endodônticas e 31 (1,0%) foram terceiros molares retidos e com indicações de extração. A análise de regressão logística foi realizada para investigar a associação entre variáveis independentes com cinco dentes perdidos devido a periodontite. Somente a idade (> 60 anos) e tabagismo foram estatisticamente significativos. As conclusões deste estudo foram consistentes com estudos anteriores. Pacientes com idades mais avançadas e fumantes foram mais sensíveis à perda dentária periodontal. Além disso, pacientes portadores de periodontite crônica generalizada foram tratados e mantidos por períodos de longo prazo com baixas taxas de perda dentária.

Haffajee, Torres e Socransky (2007) realizaram um estudo de acompanhamento de 1 ano, observando as alterações clínicas após quatro diferentes terapias periodontais para o tratamento da periodontite crônica. Este estudo comparou pacientes tratados unicamente com raspagem, alisamento e polimento radicular (RAP) e ou RAP associado com azitromicina administrada sistematicamente, com metronidazol ou uma sub dose de doxiciclina. Noventa e dois indivíduos com periodontite crônica foram selecionados para este estudo. Todos maiores de 20 anos de idade, em bom estado de saúde geral, com mínimo de 20 dentes naturais, pelo menos 1 molar em cada quadrante e com oito sítios com profundidade de sondagem (PD) >4mm. Os indivíduos eram excluídos quando possuíam alergias para os antimicrobianos testados, ou se tivessem recebido terapia periodontal nos 3 meses anteriores, gestantes, ou portadores de doenças sistêmicas. Estes indivíduos incluídos na pesquisa possuíam idade média de 46 anos (22-77 anos), sendo 36% do sexo feminino, 63% brancos, 26% afro americanos, 7% hispânicos e 4% asiáticos. Os indivíduos foram agrupados em grupos de 4 indivíduos para um das 4 opções de tratamento, que consistiram em RAP isoladamente, RAP combinada com Azitromicina em 500mg ao dia durante 3 dias, ou sistematicamente administrado em doses de 250mg por 14 dias ou ainda

20mg de Doxiciclina (SDD, Periostat®) por 12 semanas. RAP foi executada em um quadrante por consulta sob anestesia local e com intervalos semanais. As terapias antimicrobianas foram iniciadas em associação com a primeira consulta de RAP. Os pacientes foram clinicamente monitorados no início do estudo (antes do tratamento), e em 3,6 e 12 meses após terapia. Além disso, todos os indivíduos receberam visitas de manutenção e RAP complementar após terapia. Em todas as visitas de acompanhamento foram registrado níveis de gengivite (0 / 1), sangramento a sondagem (0 / 1), supuração (0 / 1), profundidade de sondagem (0 / 1), e nível de inserção clínica foram medidos em seis sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, distolingual, lingual e mesiolingual). A profundidade de sondagem e o nível de inserção clínica foram tomadas em cada visita através da sonda periodontal *Hu-Friedy* e as médias dos pares destas medidas foram utilizadas para determinar as alterações nestes parâmetros, e todas as medidas foram feitas por um mesmo examinador. Os tratamentos dos pacientes foram executados por outros clínicos independentes dos que fizeram as sondagens clínicas perfazendo um total de 4 clínicos entre os que executaram o tratamento e os que realizaram os exames. Os resultados demonstraram que todos os grupos apresentaram melhora clínica após 12 meses, e nos pacientes que receberam terapia associada aos antimicrobianos mostrando uma resposta ligeiramente melhor. Sítios com profundidade de bolsa iniciais >6 mm mostraram significativamente maior redução da bolsa e ganho de inserção nos indivíduos que receberam metronidazol ou azitromicina do que nos indivíduos dos outros grupos. Alguns indivíduos apresentaram perda de inserção aos 12 meses em cada grupo, variando de 15% para 39% dos indivíduos tratados com Doxiciclina e os tratados somente com RAP respectivamente. Os autores concluíram com base nos resultados deste estudo, que a terapia periodontal prevê benefícios clínicos e que os antibióticos proporcionam um aumento destes benefícios clínicos quando comparado com o tratamento através de RAP isoladamente, particularmente em bolsas periodontais inicialmente mais profundas.

Matuliene et al. (2008) promoveram um estudo com o objetivo de investigar a influência de bolsas residuais PPD ≥ 5 mm e sangramento a sondagem (SS) após a terapia periodontal ativa (APT) sobre a progressão da periodontite e perda dentária. Este estudo consistiu de uma análise retrospectiva de pacientes com doença periodontal tratados pelos alunos da disciplina de Periodontia da

Universidade de Berna, durante o período de 1978-2002, foram acompanhados 172 pacientes, sendo 95(55,2%) do sexo feminino e 77 (44,8%) do sexo masculino, entre 14-69 anos de idade (média de 45,11anos) no exame inicial. Nas consultas iniciais (T0), foram realizados exames clínicos e radiográficos completos. Foram registrados números de dentes e implantes, bem como índices de recessão gengival e PPD em seis sítios por dente para calcular o nível clínico de penhora (CAL). Sangramento a sondagem (BOP) foram medidos em quatro sítios por dente e ou sangramento em boca toda (FMBS) também foram registrados. Mobilidade dentária e envoltimentos da furca foram avaliados. Raios X periapical de boca toda foram executados para avaliar perda óssea. Estes exames radiográficos foram novamente executados ao fim da terapia ativa (T1), e no momento da reavaliação (T2). Em T2 o exame radiográfico foi por meio da imagem radiográfica panorâmica. Utilizando os parâmetros periodontais do exame inicial (T0), todos os pacientes foram classificados como sendo de nível 1 ou 2 de acordo com o Workshop Europeu (2005) para classificação de doença periodontal: Nível 1- pacientes com perda de inserção proximal $\geq 3\text{mm}$ em ≥ 2 dentes não adjacentes e Nível 2- presença de perda de inserção $\geq 5\text{mm}$ em $\geq 30\%$ dos dentes presentes. Todos os pacientes foram tratados de acordo com o protocolo padrão de terapia periodontal (raspagem e alisamento radicular), e todos recebiam instruções de higiene oral na primeira consulta. Após a avaliação dos resultados da terapia inicial, procedimentos cirúrgicos eram realizados se indicado. Ainda foram realizadas terapias com implantes dentários ou próteses fixas dento suportadas no final do tratamento. Após a conclusão do tratamento periodontal, estes pacientes participaram do programa de manutenção periodontal (SPT) nas Clínicas da Universidade de Berna. O momento de re avaliação (T2) foi após uma média de $11,3 \pm 4,9$ anos (intervalo de 3-27 anos), após a conclusão da terapia periodontal. A média de idade dos pacientes no momento da reavaliação era de 56,11 anos. Através de um questionário foram avaliados tabagismo, estado de saúde e frequência de visitas de manutenção de tratamento, durante os estágios T0 e T2. Ficou definido como progressão da doença periodontal, pacientes que apresentaram pelo menos dois dentes com perda de inserção proximal $\geq 3\text{mm}$ entre o final da terapia (T1) e a reavaliação (T2). A associação de fatores de risco, com perda dentária e progressão da periodontite foi investigada usando análise de regressão logística multinível, o que permitiu obter

como resultados que o número de PPD residual aumentou durante a terapia de suporte. Profundidades de sondagens (PPD) ≤ 3 mm comparadas com PPD = 5mm representam um fator de risco para a perda dental respectivamente em níveis locais. Os correspondentes odds ratio para PPD = 6 mm foram 9,3 e 11,0 e para PPD ≥ 7 mm foi de 37,9 e 64,2 respectivamente. Os pacientes identificados inicialmente como grandes fumantes, com longa duração da terapia de suporte periodontal e PPD ≥ 6 mm e BOP $\geq 30\%$ representaram um significativo risco para perda dentária. Os autores concluíram a partir deste estudo retrospectivo que bolsas residuais ≥ 6 mm representam um tratamento incompleto da terapia periodontal e exigem novas ações terapêuticas.

Del Peloso Ribeiro et al. (2008) realizaram um estudo cujo objetivo foi caracterizar clinicamente, microbiologicamente e imunologicamente a terapia de raspagem e debridamento radicular como uma abordagem terapêutica para a periodontite crônica severa. Foi um estudo concebido como de caráter paralelo, randomizado e duplo cego controlado, onde foram selecionados e distribuídos aleatoriamente 25 pacientes apresentando pelo menos oito dentes com uma profundidade de bolsa a sondagem (PPD) do ≥ 5 mm e sangramento à sondagem (SS) e evidências radiográficas de perda óssea devido a periodontite crônica. Os indivíduos deviam possuir ainda pelo menos 2 bolsas subgengivais com profundidades ≥ 7 mm, e excluiu-se indivíduos portadores de doenças sistêmicas que tornassem imperativo o uso de antibióticos pré operatório, gestantes, os que submeteram-se a tratamento periodontal nos últimos 6 meses, fumantes e usuários de aparelhos ortodônticos. Estes pacientes receberam previamente instruções sobre higienização oral caseira. Os pacientes foram divididos em 2 grupos, recebendo o grupo 1: tratamento periodontal convencional com intervalo de uma semana entre os atendimentos e os pacientes do grupo 2 receberam a raspagem, alisamento e polimento radicular em uma única sessão de boca toda em intervalo máximo de 45 minutos. Apenas um clínico foi responsável pela execução da terapia mecânica nos dois grupos, sendo este diferente dos examinadores calibrados, responsáveis pela sondagem. Os seguintes desfechos clínicos avaliados foram: índice de placa, sangramento a sondagem (BOP), posição da margem gengival, nível de inserção relativa (RAL) e profundidade de bolsa a sondagem (PPD). Foram coletadas amostras de raspados subgengivais nas bolsas com profundidades de 5mm e 7mm,

nos períodos pré operatório, e no 3º e 6º mês após a terapia. A PCR em tempo real foi utilizada para análise quantitativa de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*. O método ELISA utilizando kits comerciais para a detecção de IL-1, Prostaglandina E2, Interferon gama (INF- γ) e interleucina 10 (IL-10). Este método permitiu a detecção de IL-1b, prostaglandina E2, INF-g e IL-10 no fluido crevicular gengival (GCF). Todos os parâmetros foram avaliados no momento inicial, e em 3 e 6 meses após o tratamento. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para o registro da diferença entre os grupos. E o teste Friedman foi utilizado para observar a diferença entre os grupos nas médias de profundidade de bolsa a sondagem, inserção relativa, sangramento a sondagem, posição da margem gengival, contagem bacteriana e mensurar os níveis de citocinas. Os resultados obtidos foram que ambos os grupos apresentaram médias semelhantes de redução de profundidade de sondagem e ganho de fixação ao longo do tempo. Além de uma redução significativa do nível bacteriano após o tratamento em ambos os grupos, já a análise microbiológica falhou em demonstrar a existência de diferenças significativas entre os dois grupos. Por último, não houve diferença entre os grupos com relação aos níveis de mediadores inflamatórios no GCF. Concluíram que debridamento periodontal em uma única sessão obteve resultados clínicos semelhantes em níveis clínicos, microbiológicos e imunológicos quando comparados com terapia periodontal convencional, sendo, portanto, uma abordagem viável para tratar periodontites crônicas graves.

Lorentz et al. (2009) realizaram um estudo prospectivo em indivíduos em fase de terapia de manutenção periodontal através de análises de parâmetros clínicos periodontais, fatores preditores de risco e de progressão da periodontite. O objetivo do estudo foi avaliar a progressão da periodontite e a influencia de variáveis de risco nos indivíduos em fase de manutenção que frequentavam o ambiente acadêmico. Selecionaram um total de 250 indivíduos tratados na Clínica de Periodontia da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de Junho de 2004 a Março de 2006. Estes indivíduos foram convidados a participar do estudo e foram então enquadrados em: A- cooperadores, quando se apresentaram em 100% das visitas; B- cooperadores irregulares, quando perderam algumas das visitas agendadas e apresentaram frequências irregulares e, C- não cooperadores, que foram os que não se apresentaram em qualquer das visitas de manutenção. Durante

os 12 meses de acompanhamento, o período trimestral das visitas variou de 105 a 132 dias (média de 108,9 dias). A partir desta classificação, a frequência dos indivíduos ficou sendo de 150 de cooperadores (60%), 38 indivíduos como cooperadores irregulares (15,2%), e 62 (24,8%) foram não cooperadores, ficando a amostra selecionada apenas com os cooperadores (n=150). Estes participantes foram monitorizados em quatro visitas subsequentes, registradas como PMT1, PMT2, PMT3 e PMT4. Os critérios de inclusão foram: indivíduos com boa saúde geral submetidos à terapia periodontal inicial não cirúrgica, diagnosticados com periodontite crônica moderada ou avançada antes do tratamento periodontal ativo, com pelo menos quatro sítios com profundidade de sondagem $\geq 4\text{mm}$ (PD), perda de inserção clínica $\geq 3\text{mm}$ (CAL), e sangramento a sondagem (+/-) e evidência radiográfica de perda óssea, que realizaram terapia periodontal ativa em menos de 4 meses antes de entrar no programa e com pelo menos 14 dentes na cavidade oral. Coletou-se dados relacionados com as seguintes características: sexo, idade, renda familiar, escolaridade, índice de placa, número de dentes presentes, tabagismo e presença de Diabetes (valores de glicemia >110 mg registrados em PMT1 e repetidas em PMT4). É importante salientar que não houve intenção de caracterizar a amostra de acordo com a etnia, devido às dificuldades na determinação de raça na população do Brasil. Os exames clínicos para registro de dados como PD, CAL, sangramento a sondagem (+/-) e supuração (SU), foram registrados por um único periodontista. Imagens radiográficas foram registradas no período da terapia periodontal ativa e em PMT4. A entrevista para registro dos dados socioeconômicos dos pacientes também foram executadas em quatro momentos, e qualquer mudança no perfil social do indivíduo foi registrado. Sítios como PD $\geq 4\text{mm}$ e CAL $\geq 3\text{mm}$ e sangramento a sondagem e ou supuração foram determinados como necessários retratamento, sendo executadas novas terapias periodontais. O efeito das variáveis de interesse sobre as condições do estado periodontal e a progressão da periodontite foi testado por análises logísticas univariadas e multivariadas. Os resultados demonstraram que um total de 130 indivíduos (86,7%) mostraram se estáveis quanto a saúde periodontal, enquanto 20 indivíduos (13,3%) apresentaram progressão da periodontite. Vinte e oito indivíduos (18,66%) apresentaram perda dentária, o que resultou em um total de 47 dentes perdidos (1,38%). Diabetes não foi associada com a progressão da periodontite. O tabagismo foi significativamente

associado com uma maior progressão da periodontite. A partir dos resultados, concluiu-se que programas de manutenção periodontal em ambientes acadêmicos podem estabilizar a condição periodontal obtida após a terapia periodontal ativa, bem como controlar a ação das variáveis de risco para a progressão da periodontite.

Moene et al. (2010) realizaram um estudo cujo objetivo era comparar um dispositivo com ar pressurizado, água e aminoácido glicina na remoção de biofilme radicular em bolsas subgengivais maiores que 5mm em relação a raspagem e alisamento radicular convencional. Foram selecionados 50 pacientes em fase de manutenção periodontal de 3 a 24 meses pós terapia e que possuíam bolsas subgengivais residuais maiores que 5mm em ao menos dois quadrantes diferentes. Todos os indivíduos receberam instruções de higiene bucal e foram tratados com raspagem e alisamento radicular profunda em bolsas de um quadrante, sem anestesia e nas bolsas subgengivais do outro quadrante foi aplicado o dispositivo de ar comprimido por 5 segundos. Amostras microbiológicas foram coletadas de sítios tratados e de sítios controles em 2 dias antes e 7 dias após o tratamento através de cones de papel estéreis inseridos nas bolsas subgengivais por 10 segundos. Os seguintes parâmetros clínicos foram registrados em seis sítios de cada dente, nos dois quadrantes do estudo: índice de placa (PI), sangramento à sondagem (SS) recessão, e (REC; positivo se a margem gengival fosse localizada apical à junção cimento-esmalte, negativo se for coronal situado à junção cimento-esmalte). Foram analisados os seguintes microrganismos periodontopatogênicos: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Aa), *Fusobacterium nucleatum* spp. (Fn), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Treponema denticola* (Td), e *Tannerella forsythia* através do método da reação da polimerase em cadeia em tempo real. Resultados demonstraram que nenhum evento adverso foi observado em qualquer indivíduo para o tratamento teste ou o tratamento controle. Utilizando uma escala analógica visual, para a percepção dos pacientes no tratamento de teste para ser significativamente menos dolorosa / desconfortável do que a instrumentação manual (P <0,001). Significativamente menos tempo foi usado pelo operador para o procedimento de teste (P <0,001). A redução do sangramento à sondagem foi significativa para os locais tratados no teste e quadrantes controle (P = 0,019 e P <0,001) respectivamente. Os pacientes do grupo teste (tratados com ar comprimido) apresentaram taxas iniciais e pós 7 dias

de terapia de Aa em 14% e 10% com redução de 43%, Fn 64% e 56% e redução de 32%, Pg em 44% e 36% com redução de 18%, Pi 32% e 28% e redução de 19%, Td 56% e 48% com redução de 15%, e Tf 60% e 56% com redução de 13%. Para os indivíduos tratados com terapia periodontal mecânica convencional os valores de patógenos encontrados inicialmente e após 7 dias foram de : Aa 12% e 14% , Fn 60% e 60%, Pg 44% e 36%,Pi 24% e 20%,Td 58% e 42% e Tf em 68% e 52%. Concluíram que o polimento subgengival com ar torna se um novo dispositivo de tratamento periodontal seguro, sendo mais aceitável pelo paciente e realizado em menor tempo, embora a nível microbiológico não foi superior a terapia mecânica convencional.

2.3 Reação da Polimerase em Cadeia

Ashimoto et al. (1996) realizaram um estudo envolvendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção de 8 patógenos periodontais putativos em placa subgengival de gengivite e de lesões avançadas de periodontite. O estudo utilizou um método da reação em cadeia da polimerase através da 16S rRNA específico para a detecção e prevalência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Prevotella nigrescens* e *Treponema denticola* em 50 pacientes com periodontite avançada, 50 adultos com gengivite e 50 pacientes pediátricos com gengivite. As amostras foram obtidas de áreas com maiores profundidades de bolsas em cada quadrante de cada paciente, e removidas através de pontas de papel estéreis inseridas e mantidas durante 10 segundos nestas bolsas. Foram determinados primers específicos para cada espécie estudada. Resultados demonstraram prevalência de periodontite avançada, gengivite de adultos e pediátrica de 30%, 14% e 14% para *A. actinomycetemcomitans*, 86%, 18% e 8% para o *T. forsythia*, 74%, 52% e 78% para *C. rectus* , 80%, 70% e 66% para a *E. corrodens*, 70%, 10% e 14% para *P. gingivalis*, 58%, 12% e 18% para *P. intermedia*, 52%, 20% e 22% para *P. nigrescens*, e 54%, 16% e 16% para *T. denticola*, respectivamente. A prevalência foi maior no grupo com periodontite avançada do que em ambos adultos e portadores pediátricos de gengivite para *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T.*

denticola em $p < 0,01$, e para a *E. corrodens* em $p < 0,05$. A prevalência de *C. rectus* foi significativamente maior na periodontite avançada do que no grupo de adultos com gengivite em $P < 0,01$. Correspondência entre os resultados da PCR e cultura ocorreu em 28% (*T. forsythia*) e em 71% para (*A. actinomycetemcomitans*) das amostras, a maior discrepância ocorreu na categoria PCR-positivo/cultura-negativa. Correspondência entre os resultados da PCR e métodos de sonda de DNA foram encontrados em 84% dos indivíduos (*T. forsythia*) e 70% (*P. gingivalis*). Em conclusão, este estudo demonstrou a utilidade de uma base de 16S rRNA do método de PCR para identificar importantes microorganismos subgengivais. Os resultados indicaram uma forte associação entre as espécies estudadas e periodontite. Várias relações simbióticas anteriormente não declaradas foram encontradas entre as 8 espécies testadas.

Albandar et al. (1996) realizaram um estudo cujo objetivo foi executar reação de PCR específica para o gene da bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Foi também um dos objetivos deste estudo desenvolver primers de PCR específicos para os genes da *A. actinomycetemcomitans*. Dois conjuntos de primers foram desenvolvidos com base nas sequências genéticas de 16s RNA de vários microorganismos. O primeiro conjunto amplifica uma grande parte das pequenas subunidades dos genes 16S rRNA de várias estirpes de bactérias comumente encontradas na bolsa periodontal. Para desenvolver estes primers foram utilizadas sete linhagens de *A. actinomycetemcomitans*; estes foram ATCC 33384, SUNY 75, SUNY 366, FDC Y4, FDC 511, FDC 2097 e FDC 2112. Além disso, uma cepa de *Haemophilus aphrophilus* (ATCC 33389) e de uma estirpe de *Escherichia coli* K12 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A.), e uma cepa *Bacillus cereus* ATCC 10987 foram também utilizados. Obteve-se os seguintes resultados: O par U1/U2, que foi utilizado como cartilha para um controle positivo, em uma grande porção da Subunidade menor do RNA ribossomal 16S de *A. actinomycetemcomitans* foram amplificados com sucesso. *H. aphrophilus* e *E. coli* foram espécies empregadas neste estudo e gerou, como esperado, uma 1306 pb de longo fragmento de DNA nos tubos da reação compreendendo essas linhagens. Tubos de Reação contendo *B. cereus* e do DNA humano, porém, não geraram amplificação dos produtos. A identidade desse produto foi posteriormente confirmada pela hibridização da técnica do DNA, usando a sonda 24-marcadora do

A. actinomycetemcomitans oligonucleotídeo – específica. Esta sonda hibridizada para produtos de reações de PCR em que *A. actinomycetemcomitans* foi utilizado como um modelo, que não ocorreu hibridização com produtos PCR em que *H. aphrophilus* e *E. coli* foram utilizadas. A segunda reação de PCR utilizou os primers UI / S e foi otimizada para amplificar uma base de 449 região longas de cepas apenas de *Actinomycetemcomitans*. O primer específico (S) hibridizado com sucesso a sua região complementar dentro da 16S rRNA do gene da *A. actinomycetemcomitans*. Isto ficou evidente pela geração de 449 pb longo quando o produto da PCR de um par primer UI / S foi utilizado em reações contendo cada um dos sete estirpes *Actinomycetemcomitans* que não foram detectados em produtos da reação PCR, em tubos contendo *H. aphrophilus*, *E. coli*, *B. cereus* e do modelo de DNA humano. A sonda do oligonucleotídeo 21-marcador que foi sintetizado para orientar a 449 pb longo produto PCR, hibridizado aos produtos originários de todas as sete linhagens de *A. actinomycetemcomitans*, o que indica que os segmentos amplificados pertencem ao 16S subunidades do rRNA deste organismo. A PCR específica da *A. actinomycetemcomitans* descrita no presente relatório com sucesso, foi diferenciada entre estes dois microorganismos e pode ser útil na identificação de *A. actinomycetemcomitans* em amostras clínica e na confirmação da identidade dos microrganismos cultivados em laboratório. As vantagens do atual método em comparação com métodos reportados anteriormente é que este permite obter uma região altamente conservada do material genético, e com a aparente ausência de falsos resultados positivos com o acolhimento e não acolhimento de agentes contaminantes.

Doung-udomdacha et al. (2000) realizaram um estudo com um método de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) de forma quantitativa para enumerar *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. O objetivo principal do estudo foi elaborar um método específico e simples para enumerar tais patógenos. As amostras bacterianas foram obtidas de placas subgengivais coletadas com curetas inseridas nos fundos das bolsas subgengivais e armazenadas em tubo estéril contendo 700µl de solução de transporte. O método depende da inclusão de Brometo de Etídio no tubo fechado de PCR e a medição de amplicons resultantes para quantificar a fluorescência gerada quando luz UV é transmitida através das paredes do tubo. Para isso, tanto o PCR e

sua detecção são realizadas no mesmo tubo. Para quantificar o número total de bactérias presentes nas amostras, a quantidade de placa entre produtos do PCR obtidos a partir das amostras foi comparada com a obtida a partir de estirpes de *E.coli* em intervalo semelhantes utilizando como referência uma curva padrão serial calibrada de 10 diluições seriadas do número conhecido de *E.coli*, sendo o número de bactérias de cada amostra computadorizada. A técnica foi também comparada com um método quantitativo-PCR e um PCR colorimétrico comercial quantitativo e revelou se, pelo menos, tão sensível, específico e confiável para enumeração das bactérias alvo. No entanto, a sua velocidade e conveniência tornam-se particularmente útil para análises de grande escala em estudos clínicos e epidemiológicos.

Morillo et al. (2003) realizaram um estudo aplicando PCR quantitativo em tempo real com base em uma única sequência de gene para detecção de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* obtidos de amostras de placa subgengival. As cepas bacterianas de *A.actinomycetemcomitans* ATCC 33384 e *P.gingivalis* ATCC 33277 foram obtidas através de técnicas de culturas em placas de Agar. Espécies de *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *T. forsythia*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium nucleatum* utilizadas para a análise de especificidade foram obtidos a partir de isolados clínicos (Faculdade de Odontologia da Universidade Complutense de Madrid). As colônias obtidas a partir da cultura foram retiradas com um instrumento descartável e inseridas em tubo com água destilada estéril. As células bacterianas foram enumeradas através da visualização em uma câmara de Petroff-Hausser. Os primers definitivos da reação foram: *A.actinomycetemcomitans* 5-ACGCAGACGATTGACTGAATTTAA-3 (posições 736-759), e *A.actinomycetemcomitans* 5-GATCTTCACAGCTATATGGCAGCTA -3 (788-812), para a *P.gingivalis* 5- CCTACGTGTACGGACAGAGCTATA - 3(1308-1332) e *P.gingivalis* 5-AGGATCGCTCAGCGTAGCATT -3 (1358-1379). Os processos de otimização das concentrações de primers para o método da PCR em tempo real foram específicos na formação de primers e dímeros. PCR convencionais foram feitos em termociclador com as seguintes sequências: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 a 95°C e 1 minuto a 60°C. Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 3% e brometo de etídio. Para o

PCR em tempo real, a cartilha seguida recomendou utilizar 0,1 μ M para ambas as espécies. Quantidades conhecidas de DNA específicos das bactérias foram utilizadas para determinar uma curva padrão. O parâmetro utilizado para avaliar a reprodutibilidade deste ensaio foi ciclo limiar, CT. Este ciclo é o número em que a reação começa a ser exponencial. A reação de cada concentração de DNA foi repetida cinco vezes. As médias e desvios-padrão foram obtidos para calcular o coeficiente de variação (CV) para cada concentração de DNA. Os resultados apontaram uma boa sensibilidade e especificidade para ambas as espécies, embora o rendimento era melhor para *A. actinomycetemcomitans*. Um bom ciclo limiar de repetibilidade foi encontrado, para coeficiente de variação inferior a 6% em cada cópia do número inicial. Concluíram que um novo método para quantificação de *A.actinomycetemcomitans* e *P.gingivalis* baseado no PCR em tempo real foi realizado. Apresentou boa sensibilidade e repetibilidade e sua aplicação permite a análise fidedigna de amostras de placas subgingivais.

Boutaga et al. (2005) executaram um estudo cujo objetivo foi comparar a PCR em tempo real com a cultura quantitativa anaeróbia para detecção e quantificação de 5 proeminentes patógenos periodontais. Foram investigados os genes dos patógenos *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium spp*. Estas amostras foram colhidas de 259 pacientes adultos diagnosticados com periodontite crônica. Estas amostras eram retiradas das bolsas subgingivais mais profundas de cada quadrante através de pontas de papel estéril e colocadas em 1.5ml de fluido reduzido de transporte e processados para cultivo anaeróbio em no máximo 4 horas após a coleta. *P.intermedia*, *P.micros* e *Fusobacterium spp* foram identificados com base na morfologia da colônia (microscópio estéreo 4-6x), pigmentos negros, colorações Gram, crescimento anaeróbio, incapacidade de fermentar a glicose, produção de indólicos e ainda a produção de conjunto específico de enzimas metabólicas. *T. forsythensis* foi identificada com base em testes bioquímicos para atividades e produção de α -glicosidase, β -glucosidase, sialidase. *A.actinomycetemcomitans* foi cultivada em placas de soja tripticase-soro-bacitracina-vancomicina (TSBV) e incubadas a 37° C em + 5% de CO₂ do ar por 3 dias .A identificação de *A.actinomycetemcomitans* foi baseada em sua característica de morfologia da colônia, pela catalase apresentando uma reação positiva, com 3% de

peróxido de hidrogénio. O número total de unidades formadoras de colónias (UFC) por amostra foi determinada. As seguintes cepas foram utilizadas como referencia na amostra cultivada para o PCR: *P.gingivalis* (W83), *T.forsythia* (isolado clínico), *A. actinomycetemcomitans* (NCTC 9710), *P.intermedia* (ATCC 25611), *P.nigrescens* (isolado clínico), *P.micros* (isolado clínico), *Streptococcus sanguinis* (isolado clínico), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845), *Prevotella denticola* (isolado clínico), *Prevotella nigrescens* (NCTC 9338), *Porphyromonas endodontalis* (isolado clínico), *Bacteroides asaccharolyticus* (isolado clínico), *Prevotella oralis* (isolado clínico), *Haemophilus influenzae* (isolado clínico), *Haemophilus aphrophilus* (isolado clínico), *Haemophilus parainfluenzae* (isolado clínico), *Haemophilus paraprophilus* (isolado clínico), *Fusobacterium nucleatum* (isolado clínico), *Fusobacterium polymorphum* (FDC 397) e 5 isolados clínicos adicionais de *Fusobacterium spp.* A partir destas amostras de placa e das culturas bacterianas diluições de 100µl foram utilizadas para a extração automatizada de DNA e purificadas com Kit Isolamento de DNA Magna Pura III (Roche Molecular Diagnostics, Almere, Holanda). Os resultados do PCR e da cultura foram congruentes em 90,3%; 76,8%; 90,7% 93,8% e 97,4% das amostras para *A.actinomycetemcomitans*, *P.intermedia*, *T.forsythia*, *P.micros* e *Fusobacterium spp.*, respectivamente. As principais diferenças entre cultura e PCR foram das amostras cultura-negativa/PCR-positivo que se elevaram 7% para *A. actinomycetemcomitans*, 20% para *P. intermedia*, 7% para *T. forsythia*, 6% para *P. micros*, e 0,8% para a *Fusobacterium spp.* Resultados cultura-positiva/PCR-negativo foram observados em <3% dos indivíduos de *A.actinomycetemcomitans*, *T.forsythia*, *P.micros*; *Fusobacterium spp.*, e em 1,9% das amostras para *P.intermedia*. Com base nestes resultados, pode-se concluir que todas as espécies bacterianas foram corretamente identificadas. O limite inferior de detecção por PCR variou entre 1-50 unidades formadoras de colónias equivalentes, dependendo da espécie. [Os resultados do PCR em tempo real mostraram um alto grau de concordância com os resultados da cultura anaeróbia. O PCR em tempo real é uma alternativa confiável para o diagnóstico quantitativo anaeróbio em amostras de placas subgingival.

Verner et al. (2006) fizeram um estudo comparativo entre a Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real versus Cultura anaeróbia para identificação de patógenos periodontais, que são eles: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*,

Porphyromonas gingivalis, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola*. As amostras foram recolhidas de 18 pacientes portadores de periodontite agressiva diagnosticada através de exames clínicos e radiológicos. Estas amostras foram colhidas através de pontas de papel estéreis em pelo menos 4 bolsas com ≥ 5 mm de cada paciente mantidas durante 20 segundos no interior das bolsas. Para os procedimentos de cultura anaeróbia utilizou-se o meio de transporte de Moller VGMA-III. As bactérias foram cultivadas em diferentes meios de cultura, sendo seletivos e não seletivos. Utilizou-se após este cultivo, meios de identificação rápida em diluições apropriadas para permitir o crescimento específico e isolamento de *A.actinomycescomitans* (TSBV médio) e *F.nucleatum* (CVE médio). Para os procedimentos do PCR em tempo real quantitativo foram avaliados os DNAs dos seguintes periopatogénos: *A.actinomycescomitans*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *T.forsythia*, *F. nucleatum* e *T. denticola*. Para esta determinação, o total de carga bacteriana foi avaliado nas amostras. As amostras de placas foram enviadas para um laboratório molecular especializado (Carpegen, Munster, Alemanha). A sensibilidade deste método é maior do que o método de cultura. O limite de detecção bacteriana é de 100 bactérias com um coeficiente de variação de 15%. Dois dias após a data da coleta, receberam um relatório da análise indicando o número de microorganismos detectados e os totais de carga bacteriana. Os resultados obtidos com PCR em tempo real foram diferentes daqueles obtidos com cultura bacteriana. As diferenças de detecção foram de 3% para *A.actinomycescomitans*, 8,33% para *P.intermedia* e 12,5% para *F.nucleatum*. No entanto, as diferenças de *P. gingivalis* e *T.forsythia* foram de 51,39 % e 36,11% respectivamente. Não foi possível a comparação para *T.denticola*, porque não puderam ser identificados na cultura. As variações encontradas foram o resultado da melhor detecção nos níveis patogénicos através da sonda de PCR. Diferentemente da cultura bacteriana, a PCR permite a detecção de *T.denticola*, que não fazem colónias de oxigénio e é sensível para este patógeno. Para *F. nucleatum*, *T. forsythia* e *P. gingivalis*, a técnica do PCR em tempo real foi mais sensível que a cultura. A conclusão deste estudo demonstrou que bons resultados foram obtidos com a técnica da PCR em tempo real para os seis patógenos periodontais. Este método parece ser indicado por sua simplicidade, rapidez e reprodutibilidade, mas não podem analisar os dados para susceptibilidade

antibiótica. O periodontista deve, portanto, escolher um destes dois métodos, de acordo com sua necessidade específica.

Morikawa et al. (2007) realizaram uma análise comparativa das bactérias periodontopatogênicas putativas subgengivais através da Reação da Polimerase em Cadeia múltipla, objetivando desenvolver uma técnica baseada em PCR mais aplicável para utilização clínica. As bactérias periodontopatogênicas selecionadas para este experimento foram: *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythia* e duas espécies não periodontopatogênicas, que são: *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus salivarius*. As amostras foram obtidas de 85 pacientes que se submeteram a tratamento ativo de periodontite e se encontravam em fase de manutenção após terapia e em 4 indivíduos saudáveis periodontalmente. Estas amostras foram retiradas com pontas de papeéis estéreis inseridos nas bolsas de maiores profundidades e então armazenados em tubos Eppendorf contendo 20µl de solução salina e armazenados a -20°C. Em todos os indivíduos foram registrados parâmetros clínicos como profundidade de bolsa, perda de inserção clínica, índices de placa e sangramento a sondagem, e então estes dados foram armazenados para utilização nas análises estatísticas. Para detectar as bactérias individualmente pelo PCR, utilizaram um conjunto de primers específicos para cada bactéria, sendo: Quimiotripsina- protease para *T.denticola*; Arg-Gingipain para *P.gingivalis*; Leucotoxina A para *A.actinomycetemcomitans*; Fosfatase ácida para *P.intermedia*; regiões intergenicas ribossomais para *T.forsythia*; Glicosiltransferase para o *S.sanguinis*; e Dextranase para *S.salivalius*. Este experimento também confirmou a amplificação específica das bactérias selecionadas aleatoriamente em amostras de placas nas análises das sequências. A frequência de detecção das bactérias foi calculada a partir dos dados das amostras das placas de PCR e obtida com a percentagem de bactérias positivas utilizando a análise de variâncias fatoriais múltiplas. De forma sucinta, os resultados demonstraram que entre as bactérias periodontais putativas, a frequência de detecção foi elevada para *T.denticola* e *P.gingivalis*, em regiões com maiores profundidades de bolsas e perda de inserção clínica. A detecção de qualquer uma das cinco bactérias periodontais pesquisadas aumentou significativamente as chances de odds ratio maior quando examinadas em pacientes com elevada profundidade de sondagem, perda de inserção clínica e

sangramento a sondagem. Baseado nestes resultados, concluíram que o sistema da reação em polimerase cadeia (PCR) múltiplo, desenvolvida neste estudo permitiu a detecção de todas as bactérias contidas em um mesmo tubo em uma única reação, dispendendo menos trabalho intensivo que da forma convencional do PCR. Estes resultados suportam o potencial uso clínico da PCR múltipla para a detecção de bactérias periodontopatogênicas e assim utilizar estas reações para traçar estratégias terapêuticas e prognósticas para cada paciente.

Gomes (2008) realizou um trabalho para comparar o efeito do controle da placa supragengival na microbiota subgengival em fumantes e não fumantes avaliados através da Reação da Polimerase em Cadeia. O estudo contou com um grupo de 45 pacientes, portadores de periodontite crônica, sendo 25 não fumantes e 21 fumantes ativos. Os pacientes incluídos na pesquisa deveriam possuir no mínimo 4 dentes com profundidade de sondagem(PPD) variando de 3 a 5 mm e mais 4 dentes com profundidade de sondagem de 6 a 10 mm, com placa supragengival, sangramento a sondagem(SS) e perda de inserção clínica (CAL). O exame inicial foi realizado em uma semana após a triagem e o estudo como um todo foi realizado em um período de 6 meses, realizando controle e intervenção e visitas semanais para instruções sobre higiene oral, e os exames microbiológicos foram colhidos em 30, 90 e 180 dias em quatro sítios por paciente (dois sítios com 305mm de PPD e dois sítios com ≥ 6 mm). Todos os pacientes foram tratados com terapia periodontal manual através de curetas Gracey e retornaram para consultas de manutenção do tratamento. Os resultados demonstraram que a carga bacteriana total reduziu significativamente ao longo dos 6 meses do período experimental, sendo que a maior diminuição ocorreu nos primeiros 30 dias após o controle da placa supragengival. As espécies de *P.gingivalis*, *D. pneumosintes* e *P.micra* apresentaram um padrão semelhante de diminuição das bactérias. As contagens de *A.actinomycescomitans* foram reduzidas no início do estudo e diminuiu ligeiramente ao longo do tempo. Aos 180 dias a média de contagens das bactérias foram relativamente baixas para todas as espécies estudadas. Uma redução nos níveis de profundidade de sondagem foi significativa ao longo do tempo em fumantes e não fumantes. Independentemente do tabagismo, sítios com elevadas profundidades de sondagem portavam maiores quantidades de bactérias totais em todo o estudo. Concluiu com este estudo que o controle da placa subgengival

promove reduções significativas na carga microbológica, independentemente da intensidade do processo inflamatório e independentemente do indivíduo ser fumante ou não fumante.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a dinâmica populacional dos seguintes patógenos periodontais putativos: *A.actinomycetemcomitans*, *T.forsythia*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *C.rectus*, *T.denticola*, *F.nucleatum*, *E.corrodens* e *P.nigrescens* antes e após a terapia mecânica em pacientes portadores de periodontite crônica.
- Avaliar os índices de profundidade de bolsas subgengivais, a presença ou ausência de sangramento e índices de placas antes e após a terapia mecânica.
- Correlacionar índices clínicos e índices microbiológicos nos pacientes pré e após tratamento mecânico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- 1- Tubos Eppendorf
- 2- Água destilada
- 3- Solução de Ringer
- 4- Sondas milimetrada tipo Williams (Hu-Friedy®)
- 5- Curetas Gracey (Trinity®, São Paulo, Brasil)
- 6- Anestésico Lidocaína 2% (DFL)
- 7- Primers específicos para reação de PCR
- 8- Oligonucleotídeos
- 9- Kit de extração de DNA (Instagene Matrix®, Bio–Rad®, Hercules, CA, USA).
- 10- Gel de agarose
- 11- Brometo de Etidio
- 12- Transiluminador UV.
- 13- Termociclador (Techne® TC-412 Thermal Cycler).

4.2 Métodos

4.2.1 Seleção dos pacientes

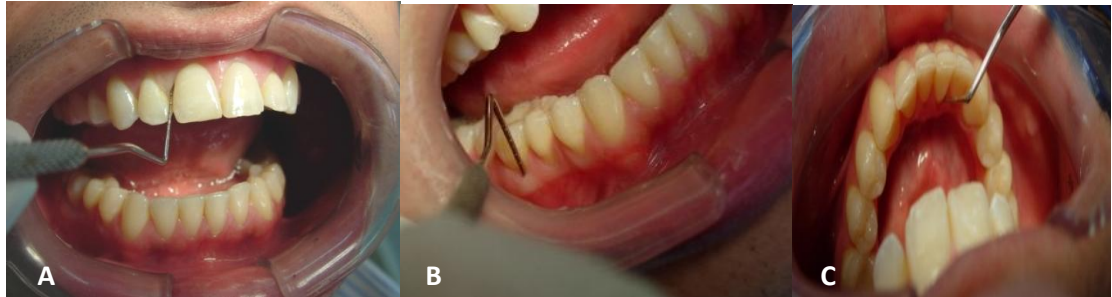
Foram incluídos neste estudo 20 indivíduos de ambos os gêneros, maiores de 18 anos, previamente diagnosticados com periodontite crônica não tratada, através de tomadas radiográficas de todos os elementos e parâmetros clínicos como profundidade de bolsa, sangramento a sondagem e índice de placa. Estes pacientes foram selecionados nas Clínicas de Graduação de Periodontia I, Semiologia II e Clínica de Pós Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Foram excluídos os indivíduos portadores de doenças sistêmicas que necessitariam profilaxia antibiótica para a realização da terapia periodontal, gestantes e lactantes, assim como indivíduos não normorreativos. Excluiu-se ainda indivíduos submetidos à

antibioticoterapia nos últimos três meses, os que receberam tratamento periodontal nos 12 meses antecedentes ao início do estudo, assim como os pacientes submetidos ao tratamento proposto pelo estudo, mas que fizeram uso de antibioticoterapia durante os 90 dias após o tratamento. Todos os participantes foram informados quanto ao objetivo do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o nº 459/2007. Os pacientes que não concordaram em participar do estudo, não deixaram de receber o tratamento adequado.

4.2.2 Critérios de diagnósticos clínicos

Para o estabelecimento do diagnóstico clínico, realizou-se exame clínico periodontal com espelho plano nº 5 e sonda periodontal milimetrada tipo Williams (*Hu Friedy® manufacturing Inc., Chicago. IL, USA*). A sondagem clínica periodontal foi realizada em 6 pontos por dente (Figs.1A ,B e C), sendo três por vestibular (mésio-vestibular, vestibular e disto-vestibular) e três por lingual ou palatina (mésio-lingual ou mésio-palatina, palatina ou lingual, disto-lingual ou disto palatina) (Armitage 2004). Esta profundidade de sondagem foi determinada inicialmente em todos os dentes e registrada em um formulário (Anexo 1) juntamente com os dados principais do paciente: nome, idade, sexo e data do exame. Esta sondagem inicial era executada pelo pesquisador responsável, juntamente com registros através do método dicotômico de ausência ou presença de sangramento a sondagem (0/1) e índice de placa (0/1) (TAKAMATSU et al., 1999). A partir de então, foram selecionados quatro sítios com bolsas periodontais com profundidade superior a 4mm em cada indivíduo, perfazendo um total de oitenta sítios analisados. Terceiros molares não foram incluídos no estudo.

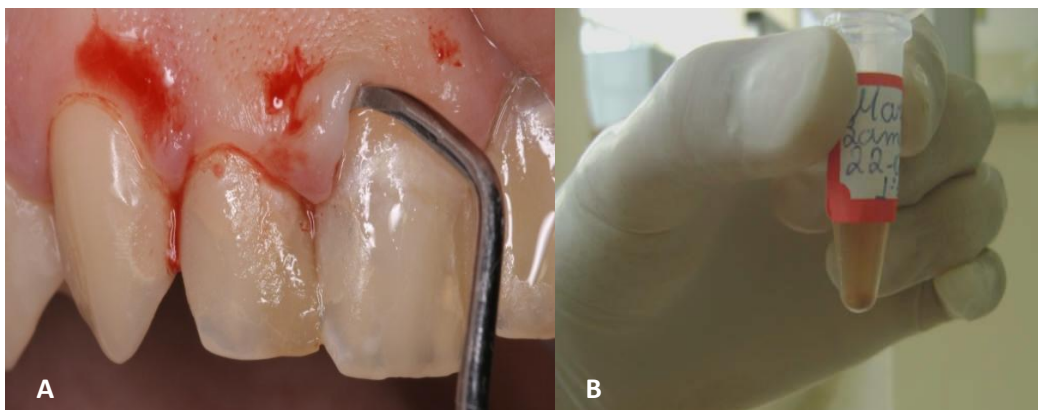
Também foram executadas tomadas radiográficas periapicais através da técnica do paralelismo em todos os pacientes para evidenciação de perda óssea horizontal, característica de doença periodontal crônica (CARRANZA et al., 2006).



Figuras 1 A, B e C. Sondagem de profundidade de bolsas pré tratamento

4.2.3 Coleta e Armazenagem das amostras de placa

Amostras de placa bacteriana subgingival foram obtidas dos sítios selecionados de todos os indivíduos, previamente à terapia mecânica. Os dentes selecionados foram isolados com roletes de gaze e a placa bacteriana supragengival foi removida com algodão esterilizado. A placa bacteriana subgingival foi coletada (Fig. 2A) juntamente com o cálculo subgingival com auxílio de cureta Gracey (Trinity®, São Paulo, Brasil) estéril e armazenada em um recipiente estéril contendo 0,5ml de água destilada (Fig. 2B) no qual constava uma etiqueta com identificação do paciente e data da coleta (HAFFAJJE et al., 2007).



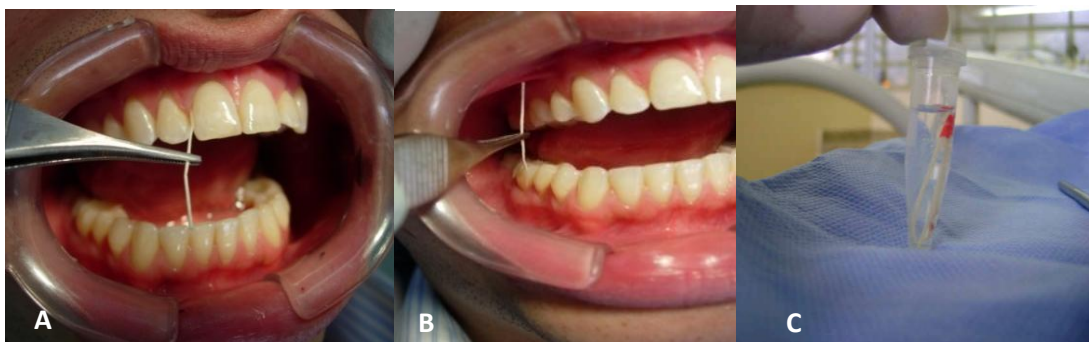
Figuras 2 A e B- Coleta de raspado subgingival pré-operatório e armazenamento em Eppendorf

Os recipientes com as amostras coletadas foram armazenados sob refrigeração a -20°C para posterior análise microbiológica.

Após 90 dias da realização da terapia mecânica, uma nova amostra da placa subgengival foi obtida dos mesmos sítios coletados inicialmente (Fig. 3A e 3B). Esta segunda coleta da placa subgengival, era obtida com quatro pontas de papel absorvente nº 35-50 (Maillefer, Dentsply, Oklahoma, EUA), esterilizada, que foram inseridas na porção mais apical da bolsa periodontal, com auxílio de pinças clínicas e mantidas no local por 20 segundos (HUI-WEN YANG, 2004). Estas pontas de papel foram colocadas em um recipiente com a identificação do paciente e data da coleta, contendo 0,5ml de água destilada (Fig. 3C) e foram armazenados a -20°C até o momento da análise no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde eram processadas juntamente com as amostras da primeira coleta. As bactérias encontradas foram assinaladas em uma tabela, que constava os microrganismos encontrados tanto no período que antecedeu ao tratamento quanto após 90 dias (Anexo 2).

É importante destacar que a primeira coleta foi removida juntamente com o cálculo, e, portanto pode ser armazenada sob refrigeração por tempo indeterminado. A segunda coleta foi realizada após a terapia mecânica e, por isso, foi coletada com cones de papel estéril, pois esperava-se que não houvesse presença de cálculo subgengival.

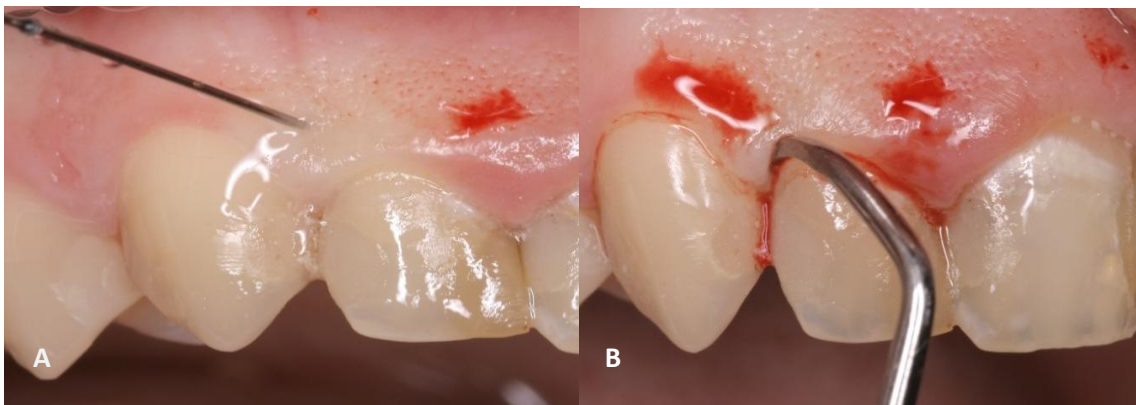
No ato da segunda coleta, também executou-se uma nova sondagem da profundidade das bolsas periodontais, por um outro periodontista previamente calibrado com o pesquisador responsável que executou a primeira sondagem. O periodontista responsável pela segunda sondagem, em momento algum, obteve acesso aos valores de sondagem do primeiro exame, e registrou estes valores em uma segunda tabela do formulário (Anexo 1) para posterior comparação com a primeira sondagem.



Figuras 3 A ,B e C: Coleta de amostra 90 dias após terapia mecânica através de cones de papel.

4.2.4 Terapia Mecânica

Todos os pacientes que participaram do estudo receberam tratamento, que se constituiu de anestesia infiltrativa papilar (Fig. 4A) seguida de acurada raspagem, alisamento e polimento radicular (Fig. 4B) executados pelo pesquisador responsável. Estes procedimentos foram realizados em todos os elementos dentais, divididos por sextante (18-14, 13-23, 24-28, 38-34, 33-43, 44-48) ou de acordo com as necessidades individuais (Haffajee 1997). Este tratamento não ultrapassou o período máximo de 4 semanas, sendo cada hemi arco dental tratado semanalmente. Para tal procedimento foram utilizadas curetas do tipo Gracey nºs 5-6, 7-8, 11-12, 13-14 (Trinity®, São Paulo, Brasil). Estes pacientes receberam instruções sobre higiene oral para controle de placa e receberam também ao final do tratamento 2 escovas dentais de cerdas macias, de tamanho médias (Colgate Professional Extra Clean®, São Paulo, Brasil) sendo instruídos a utilizar cada uma das escovas por 45 dias e foram ainda chamados para consultas de revisão. Qualquer alteração no estado de saúde bucal do paciente foi considerada e se necessário, novas raspagens e polimentos radiculares foram realizados.



Figuras 4 A e B: Fases da terapia mecânica.

4.2.5 Análise microbiológica dos espécimes coletados

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi realizada em condições previamente padronizadas para os diferentes grupos microbianos a serem

pesquisados, a saber: *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores já descritos na literatura.

4.2.6 Obtenção do DNA bacteriano

As amostras de raspados subgengivais e cones de papel com fluido subgengival foram homogeneizados no agitador Vortex por 30s e as pontas de papel removidas de todas as amostras. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g a 4°C durante 5 minutos em uma microcentrifuga refrigerada (Heraeus Biofuge 15R, Heraeus Equipment Ltd., Brentwood, Uk). O DNA foi extraído usando-se o Kit InstaGene Matrix© (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em síntese, o sedimento resultante foi lavado 3 vezes em 500µl de soro fisiológico para cada amostra e suspenso em 150µl da solução de lise fornecida pelo kit. Em seguida, esta solução foi transferida para um tubo de microcentrifuga incubado a 56°C por 30 minutos. As amostras foram novamente homogeneizadas e fervidas (100°C) durante 10 minutos para obtenção de DNA. Após nova centrifugação (10.000x g por 3 minutos) para remover células não lisadas e restos celulares, 145µl do sobrenadante foram pipetados para um novo tubo de microcentrifuga estéril e armazenados em freezer a -20°C para posterior análise (GHIZONI, 2007).

4.2.7 Detecção de DNA bacteriano nos extratos obtidos (PCR Universal)

Como controle positivo para obtenção de DNA bacteriano, foi realizada uma reação de PCR inicial a partir dos extratos obtidos utilizando-se os iniciadores universais para DNA codificador para RNA 16S bacteriano 341F e 1391F (KULECKI et al., 2008). As reações foram montadas usando-se 1µl de cada iniciador em reações de 25µl contendo 2 X PCR master mix (*Promega Corporation*®, USA) (50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5mM MgCl₂, 200µM de dATP, dTTP,

dCTP, e dGTP, Taq DNA polimerase) e 2ul de DNA molde nas reações com extrato de DNA obtido de raspado e 4ul de DNA molde na reações com extrato obtido de amostra coletada com cone de papel após a terapia mecânica. A quantidade de DNA utilizada nas reações foi considerada após quantificação espectrofotométrica dos extratos. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C a 1 minuto, e 72°C por 2 minutos, seguidos de um ciclo final de 72°C a 10 minutos. As reações foram feitas em termociclador (*Techne® TC-412 Thermal Cycler*), com as condições de amplificação anteriormente citadas.

Os produtos da PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (120 v, 1h) e coloração com brometo de etídio, sobre transluminador de luz ultravioleta (figura 5).

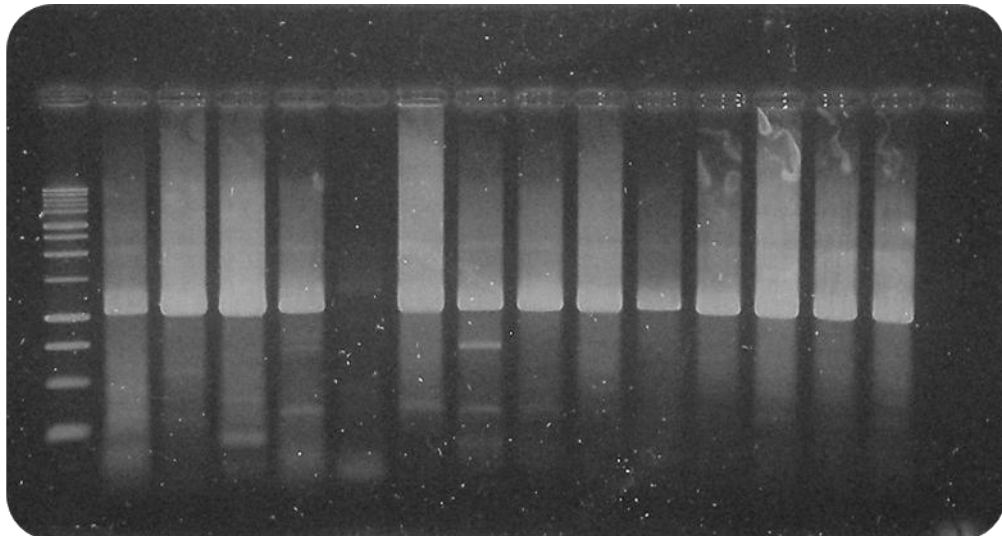


Figura 5 Imagem Eletroforética de bandas contendo DNAs bacterianos universais

4.2.8 Detecção de patógenos periodontais bacterianos

Todos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesta etapa para detecção qualitativa de patógenos periodontais bacterianos nos espécimes coletados dos pacientes antes e após o tratamento periodontal mecânico, estão descritos na tabela 1.

Para detecção de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia* e *Tannerella forsythia*, as reações foram executadas de acordo como sugerido por (KULEKCI et al.,2008) em reação de PCR multiplex, considerando-se as amostras de raspado e cone de papel. Foram utilizados igualmente 1,25µl de cada iniciador, e as reações foram montadas como descrito anteriormente. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Considerando-se *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, as reações foram executadas de acordo com (KULEKCI et al., 2008) em reação de PCR multiplex, considerando-se as amostras de raspado e cone de papel. Foram utilizados 1,25µl de cada iniciador específico para cada bactéria, e as reações foram montadas como descrito anteriormente. As condições de amplificação foram: Desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto,e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para detecção de *Eikenella corrodens* e *Fusobacterium nucleatum* foram realizadas duas reações distintas utilizando-se os iniciadores Ec1 e Ec2 para *Eikenella corrodens* (KULEKCI et al., 2008); Fn1 e Fn2 para *Fusobacterium nucleatum* (TACHIBANA et al., 2006). As reações foram montadas como descrito anteriormente utilizando-se 1,40 µl de Ec1 e 1,40 µl de Ec2 dos iniciadores na reação para *E. corrodens* e 1,5µl de Fn1 e 1,45µl de Fn2 dos iniciadores para *F. nucleatum*. Para detecção de *F. nucleatum* as condições de amplificação foram: 95°C por 2 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Para detecção de *E. corrodens* as condições de amplificação foram 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Após todas as reações de PCR, os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (1,5% em tampão tris-borato-EDTA – TBE 0,5X, por 1 hora a 120 v) e coloração com brometo de etídio, sobre transluminador de luz ultravioleta.

QUADRO 1- *Primers* para a análise de PCR

Patógenos periodontais	Sequência de <i>Primers</i>	Tamanho	Referência
<i>C. albicans</i>	5'-GCC GGT GAC GAC GCT CCA AGA GCT G-3' 5'-CCG TGT TCA ATT GGG TAT CTC AAG GTC-3'	158 bp	Yuan et al 2001
<i>P. gingivalis</i>	5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3' 5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3'	404 bp	Kulekci et al 2008
<i>T. forsythia</i>	5'-GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA-3' 5'-TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T-3'	641 bp	Kulekci et al 2008
<i>T. denticola</i>	5'-TAA TAC ATG TGC TCA TTT ACA T-3' 5'-TCA AAG CAT TCC CTC TTC TCC TTA-3'	316 bp	Kulekci et al 2008
<i>F. nucleatum</i>	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' 5'-GTC ATC GTG CAC ACA GAA TTG CTG-3'	360 bp	Tachibana et 2006
<i>P. intermedia</i>	5'-TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG-3' 5'-TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T-3'	575 bp	Kulekci et al 2008
<i>P. nigrescens</i>	5'-ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG-3' 5'-CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A-3'	804 bp	Kulekci et al 2008
<i>E. corrodens</i>	5'-CGA TTA GCT GTT GGG CAA CTT- 3' 5'-ACC CTC TGT ACC GAC CAT TGT AT-3'	410 bp	Yuan et al 2001
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	5'-AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC TTC-3' 5'-ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT-3'	557 bp	Kulekci et al 2008

4.2.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à avaliação estatística pelo McNemar Test, através do programa SPSS 13.0 *for Windows*, com índice de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

No presente estudo foram analisados 20 pacientes previamente diagnosticados com doença periodontal crônica, sendo 12 homens (60%) e 8 mulheres (40%), com idades variando de 19 a 58 anos, com média de idade de $\pm 37,8$ anos.

Todas as espécies bacterianas pesquisadas apareceram pelo menos em um dos pacientes pré-tratamento.

A espécie *A.actinomycetemcomitans* foi encontrada em 6 indivíduos pré-terapia e após o tratamento ela foi encontrada em um dos pacientes, embora este paciente não fosse positivo para A.a na análise inicial. Foi o patógeno menos encontrado nos indivíduos com doença periodontal crônica. O sucesso de redução deste patógeno após a terapia foi de 100%, uma vez que todos os indivíduos que a apresentavam na análise pré-terapia tornaram se negativos após a terapia.

Para a espécie *Porphyromonas gingivalis* obteve-se antes do tratamento 13 pacientes portadores desta, e na análise de 90 dias após a terapia, o número de pacientes portadores da *P.gingivalis* reduziu para 11. O sucesso de redução desta bactéria foi de 15% através da terapia periodontal mecânica.

Analisando a *Prevotella intermedia* encontrou se 10 indivíduos positivos para esta espécie no exame inicial, e no exame após tratamento apenas 2 indivíduos permaneceram positivos para esta bactéria, o que demonstra uma expressiva redução de 80% desta espécie nos indivíduos positivos, evidenciando um alto valor de sucesso da terapia mecânica como forma de tratamento para este patógeno.

Para a *Tannerella forsythia* inicialmente tínhamos 10 pacientes positivos e 10 negativos para esta espécie, sendo que após o tratamento dos pacientes positivos para a *T.forsythia*, 3 tornaram se negativos, mas entre os que não a possuíam 6 tornaram positivos nos 3 meses após a terapia. Na análise final, o índice de sucesso de redução desta bactéria após terapia periodontal foi de 30%.

Na análise do *Campylobacter rectus* foram identificados 19 pacientes positivos para este patógeno antes da terapia mecânica, e que permaneceram

positivos na segunda coleta no prazo de 90 dias após a terapia. Os mesmos valores e resultados foram encontrados para a *Fusobacterium nucleatum* quando analisada antes e após a terapia. Para este patógeno o sucesso de redução foi de apenas 5,3%, uma vez que um indivíduo que era positivo para o F.n tornou se negativo após o tratamento e outro paciente que era negativo na primeira análise ,tornou se positivo no exame após tratamento.

A espécie *Eikennela corrodens* foi identificada em 18 pacientes no exame inicial, e na análise após tratamento ela foi encontrada em 15 pacientes, representando um índice de sucesso de 22% para o tratamento deste patógeno através da terapia mecânica.

Analisando a espécie *Prevotella nigrescens*, o quadro inicial era de 11 pacientes positivos para esta espécie antes da terapia mecânica e 9 pacientes negativos, ao analisarmos após a terapia, constatamos que dos inicialmente positivos, 6 tornaram-se negativos e dos 9 inicialmente negativos 3 tornaram-se positivos. Estes valores representam estatisticamente uma significativa redução de 54,5% desta espécie após a terapia mecânica.

A espécie *Treponema denticola* foi encontrada em 13 indivíduos antes do tratamento radicular e na análise de 90 dias após a terapia, apenas 5 destes 13 indivíduos permaneceram positivos para esta bactéria. Estes dados representam uma taxa de sucesso de 61,5% na redução deste patógeno com a terapia mecânica. Juntamente com a P.intermedia foram as espécies de maiores índices de efetividade da terapia mecânica como forma de erradicação destas.

Para o cálculo de significância (diferença pré e pós-tratamento) foi utilizado o McNemar Test. Observamos que nas espécies A.a, P.g, Tf, C.r, F.n, E.c e P.n esta diferenciação não foi comprovada estatisticamente pré e pós tratamento (Tabela 1), embora clinicamente conseguisse evidenciar o sucesso da terapia mecânica nos pacientes periodontalmente comprometidos (Gráfico 1).

TABELA 1
Número de pacientes positivos para cada bactéria

Bactéria	Pré	Pós	Sucesso (%)	Valor P
Aa	6	1	100	0,125
Pg	13	11	15	0,5
Pi	10	2	80	0,008
Tf	10	13	30	0,508
Cr	19	19	5,3	-
Fn	19	19	0	-
Ec	18	15	22	0,375
Pn	11	8	54,5	0,508
Td	13	5	61,5	0,008

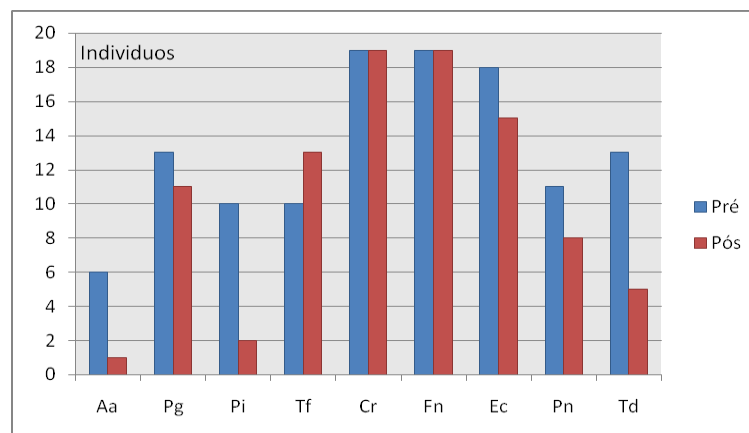


Gráfico 1. Análise de redução bacteriana pré e pós terapia por número de pacientes

As tabelas completas dos resultados descritos no item 5.1 encontra se no anexo 3.

Foi analisado as profundidades de bolsa de 6 faces de cada dente em todos os indivíduos nos momentos iniciais (pré terapia) e 90 dias após o tratamento totalizando 2561 faces analisadas (Tabela 2). Obteve se uma média de profundidade inicial de 3,05mm e após a terapia esta média foi reduzida para 2,68mm demonstrando uma redução de 0,37mm de profundidade de bolsa após terapia ($p < 0,001$). Na análise específica de cada face, as que apresentaram maior média de profundidade pré terapia foi a face Disto Palatina com 3,43mm com redução para 3,05 mm após o tratamento. As faces vestibulares foram as de menores médias de profundidade de sondagem pré-terapia, com 2,30mm e reduzindo para 2,03mm após

tratamento. As faces Disto Vestibulares foram as que apresentaram as maiores médias de redução de profundidade após o tratamento com 0,56mm de redução nas análises pré e pós-terapia.

TABELA 2

Médias aritméticas de profundidades de bolsa pré X após terapia e significância clínica (P)

Face	Pré	Pós	Valor P
V	2,302	2,032	<0,001
MV	3,07	2,684	<0,001
DV	3,308	2,743	<0,001
P	2,861	2,556	<0,001
MP	3,333	3,009	<0,001
DP	3,434	3,058	<0,001

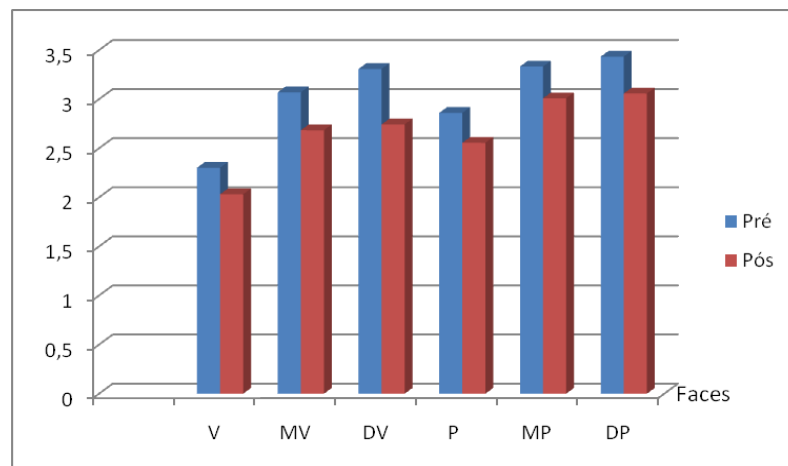


Gráfico 2. Valores de média aritmética em mm de profundidade de bolsas subgingivais antes e após terapia

Na análise dos 20 pacientes para sangramento espontâneo ou provocado pela sondagem pré-terapia, 19 foram positivos para este sintoma. Passados os 90 dias após a terapia mecânica, 15 pacientes tornaram-se não sangrantes quando da

execução da sondagem, representando um índice estatisticamente significativo de 73,7% de efetividade da terapia mecânica na redução de sangramento ($p < 0,001$).

Em 20 pacientes periodontais crônicos analisados neste estudo, 16 possuíam cálculo antes da terapia e na análise após terapia apenas 8 permaneceram positivos para este sintoma ($p < 0,08$). A terapia mecânica mostrou uma efetividade de 50% de sucesso na redução de calculo pós tratamento (Tab. 3 e Gráfico 3).

TABELA 3

Valores de frequência absoluta de sintomas clínicos pré e pós terapia

	Pré	Pós	Sucesso (%)	Valor P
Cálculo	16	8	50	<0,08
Sangramento	19	4	73,7	<0,001

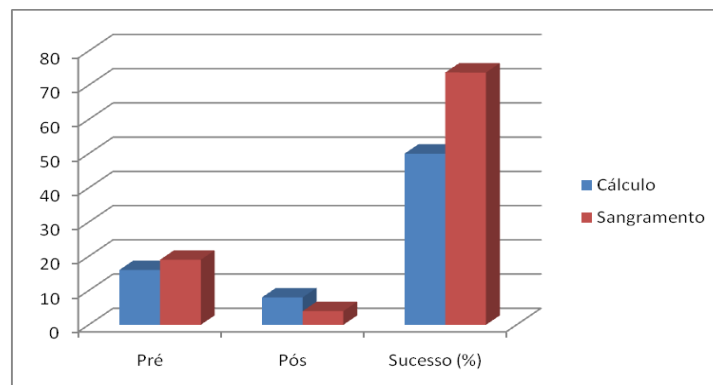


Gráfico 3. Valores de frequência absoluta de sintomas clínicos pré e pós terapia

Na análise pré-terapia, possuíamos 14 pacientes negativos para A.a, com media de profundidade/ desvio padrão de $2,997 \pm 0,737$. Enquanto que os 6 pacientes positivos apresentaram bolsas / desvio padrão $3,17 \pm 0,820$. Na análise pós tratamento, observamos que 19 pacientes estavam negativos para A.a com média de profundidade / desvio padrão de $2,706 \pm 0,639$ e 1 paciente estava positivo para esta espécie, com média de profundidade de 2,195 e sem desvio padrão.

Obtivemos a partir destes dados que quando reduz se a presença de bactéria nos indivíduos reduz-se também a profundidade de bolsas subgengivais destes. Particurlarmente, quando analisamos pacientes que eram positivos para este microrganismo e após a terapia negativaram, obtivemos uma redução média de 0,39mm de profundidade de bolsa.

Analisando a bactéria P.g nos pacientes antes da terapia, tínhamos 7 pacientes negativos para esta espécie com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $3,063 \pm 0,664$, e tínhamos 13 pacientes positivos para esta bactéria com média de profundidade de bolsa / desvio padrão $3,041 \pm 0,810$. Na análise após terapia, obtivemos 9 pacientes negativos para a P.g com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,736 \pm 0,498$ e 11 pacientes positivos para esta bactéria com média de profundidade de bolsa / desvio padrão $2,635 \pm 0,747$. Com estes dados, concluímos que a terapia mecânica reduziu em aproximadamente 0,58 mm a profundidade de bolsa quando este patógeno é reduzido nos pacientes que o possuíam antes da terapia.

Quando comparamos os resultados da *Prevotella intermédia* antes e após o tratamento, encontramos 10 pacientes negativos para esta espécie na análise pré terapia com media de profundidade de bolsa / desvio padrão de $3,354 \pm 0,692$ e ainda 10 pacientes positivos para este microrganismo com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,744 \pm 0,695$. Na análise após terapia, restaram 2 pacientes com positividade para *Prevotella intermédia* com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $1,919 \pm 0,496$. Para os 18 pacientes negativos para P.intermedia após a terapia, encontramos média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,765 \pm 0,598$. A partir destes dados, obtivemos uma redução de aproximadamente 0,7mm de profundidade de bolsa quando reduzimos a presença de *Prevotella intermédia* subgengivalmente nos portadores de peridontite crônica.

Para a espécie bacteriana *Tannerella forsythia*, antes do tratamento possuíamos 10 pacientes negativos para esta espécie com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,740 \pm 0,727$. Na mesma análise pré tratamento, contávamos com 10 pacientes positivos para *T.forsythia* com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $3,357 \pm 0,656$. Ao analisarmos estes pacientes após o tratamento, verificamos a existência de 7 pacientes negativos para este microrganismo com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de 2,876

$\pm 0,492$, e de 13 pacientes positivos para esta espécie, com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,575 \pm 0,691$. Apesar de termos um aumento no número de pacientes positivos para *T.forsythia* após a terapia mecânica, obtivemos uma significativa melhora clínica nestes pacientes, evidenciado pela redução de aproximadamente 0,06 mm de profundidade de bolsa subgingival.

Ao analisarmos *Campilobacter rectus*, encontramos 1 paciente negativo na análise pré terapia com média de profundidade de bolsa de $2,806 \pm$ e sem desvio padrão. E tínhamos 19 pacientes positivos para esta bactéria com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $3,062 \pm 0,762$. Os resultados após tratamento, apontam para 1 paciente ainda negativo para o *C.rectus* com média de profundidade de bolsa de 1,568 e sem desvio padrão, e tínhamos 19 pacientes positivos para *C.rectus* com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,739 \pm 0,592$. O *Campilobacter rectus* é um patógeno comumente encontrado na flora bacteriana, mesmo em pacientes não portadores de periodontite crônica, embora quando portadores de doença periodontal, a prevalência deste microrganismo esteja aumentada. Embora não tenhamos conseguido reduzir número de pacientes positivos para este patógeno, conseguimos obter uma redução de aproximadamente 0,86mm nas médias de profundidade de bolsa subgingival, o que demonstra que a terapia mecânica foi efetiva na melhoria da sintomatologia da doença periodontal, apesar do *C.rectus* não ter sido efetivamente reduzido.

No estudo com o *Fusobacterium nucleatum*, verificamos pré terapia a existência de 1 paciente negativo para este patógeno com média de profundidade de bolsa de 4,644mm. Encontramos 19 pacientes positivos para *F.nucleatum* com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,965 \pm 0,660$. Na análise pós terapia, obtivemos ainda 1 paciente negativo para *F.nucleatum* com média de profundidade de bolsa de 4,289 e 19 pacientes positivos para este microrganismo com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,596 \pm 0,521$. Como não tivemos redução da presença deste patógenos nas amostras pós terapia, não temos valores de redução de profundidade de bolsa associados à redução destes microrganismos.

Ao analisarmos a espécie *Eikenella corrodens*, verificamos pré terapia 2 pacientes negativos para esta espécie com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $3,326 \pm 1,865$ e 18 pacientes positivos para esta bactéria com média de

profundidade de bolsa / desvio padrão de $3,01 \pm 0,636$. Na análise após o tratamento obtivemos 5 pacientes negativos para a *E.corrodens* com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,951 \pm 0,888$ e 15 pacientes positivos com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,590 \pm 0,532$. A média de redução de profundidade de bolsa subgengival foi de aproximadamente 0,12mm após a terapia para os pacientes que também reduziram a presença da *E.corrodens*.

Para a *Prevotella nigrescens* encontramos na análise pré tratamento 9 pacientes negativos para esta espécie com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,992 \pm 0,718$ e 11 pacientes positivos para este patógeno com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $3,095 \pm 0,797$. Na análise após o tratamento, verificamos a existência de 12 pacientes negativos para a *P.nigrescens* com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,694 \pm 0,483$ e 8 pacientes positivos com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,659 \pm 0,848$. Concluimos que após a terapia periodontal mecânica os valores de redução de profundidade de bolsa subgengival foram de aproximadamente 0,28mm para os pacientes que também tiveram a presença de *P.nigrescens* reduzida.

Para a espécie *Treponema denticola*, obtivemos 7 pacientes negativos na análise pré terapia com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $3,121 \pm 0,907$ e 13 pacientes positivos para esta espécie com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $3,010 \pm 0,679$. Na análise após o tratamento, verificamos que 15 pacientes estavam negativos para *T.denticola* e com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,614 \pm 0,651$ e 5 eram positivos com média de profundidade de bolsa / desvio padrão de $2,878 \pm 0,595$. Ao final do tratamento, observamos que após a terapia mecânica, os pacientes que apresentaram redução do microrganismo estudado também apresentaram uma média de redução de profundidade de bolsa de aproximadamente 0,36mm.

Na tabela 4 e no gráfico 4 observamos os valores de redução de bolsas para pacientes positivos para cada espécie bacteriana, antes do tratamento e que se tornaram negativos após a terapia:

TABELA 4

Redução de bactéria e profundidade de bolsa após tratamento

Bactéria	Redução de bolsa após terapia
Aa	0,39
Pg	0,58
Pi	0,07
Tf	0,06
Cr	0,86
Fn	0
Ec	0,12
Pn	0,28
Td	0,36

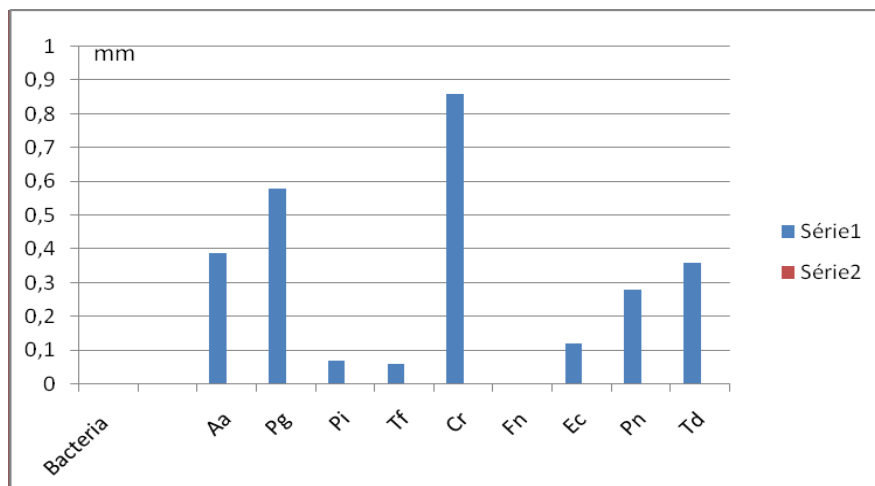


Gráfico 4. Redução de bactéria e profundidade de bolsa após tratamento em mm.

Na análise comparativa de pacientes positivos para cada espécie bacteriana e positivos para sangramento antes da terapia e que se tornaram negativos para ambos os fatores, obtivemos a tabela e gráfico 5, descritivos:

TABELA 5

Pacientes positivos para bactérias e sangramento X negativos após tratamento

Bactéria	Pré	Pós
Aa	5	14
Pg	12	7
Pi	9	14
Tf	10	6
Cr	18	1
Fn	18	0
Ec	17	2
Pn	10	11
Td	12	11

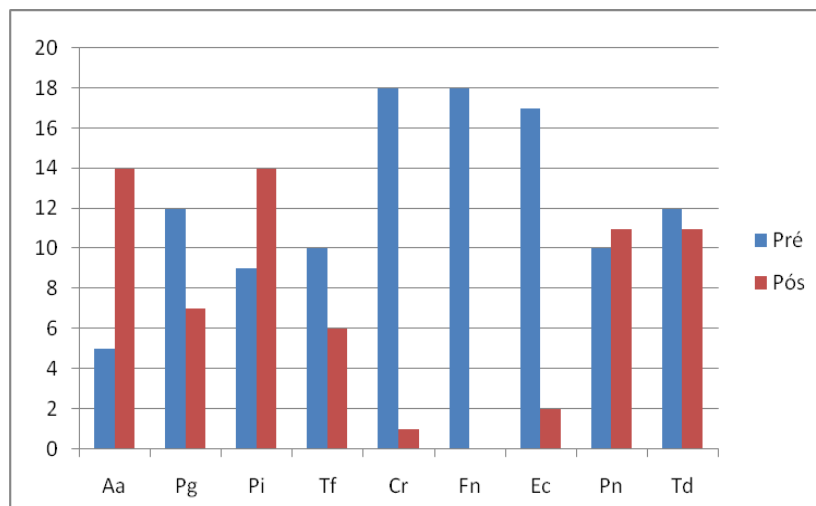


Gráfico 5. Pacientes positivos pré terapia para bactéria e sangramento X pacientes negativos pós terapia para bactéria e sangramento.

Na análise comparativa de pacientes positivos para cada espécie bacteriana e positivos para cálculo antes da terapia e que se tornaram negativos para ambos os fatores, obtivemos a seguinte tabela e gráfico 6 descritivos:

TABELA 6

Comparativa entre bactérias e cálculos positivos pré terapia X bactéria e cálculo negativo pós terapia

	Pré	Bact x Cálculo
Aa	4	11
Pg	10	4
Pi	7	10
Tf	8	3
Cr	15	1
Fn	15	0
Ec	15	3
Pn	8	7
Td	11	9

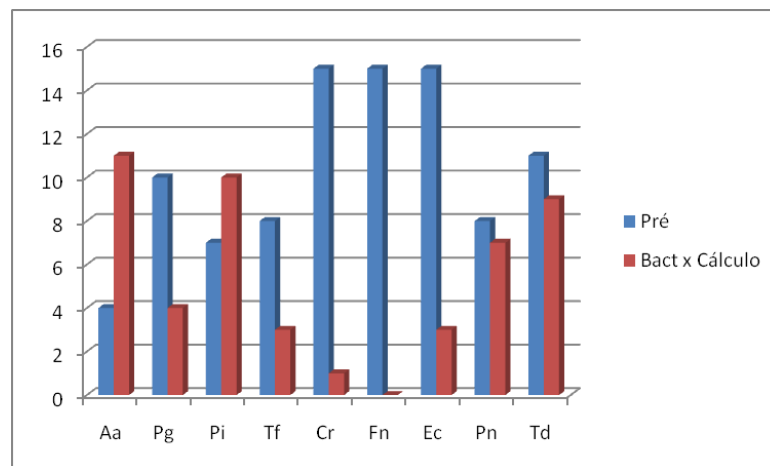


Gráfico 6. Comparativo entre bactérias e cálculo pré tratamento

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A terapia periodontal através da raspagem radicular baseia-se na remoção de elementos da superfície dentária que provocam inflamação (biofilme bacteriano e produtos originados deste biofilme) a fim de deter a perda progressiva de inserção, evitar uma nova evolução da doença e a perda do elemento dental. (KNOWLES et al., 1979; AXELSSON e LINDHE, 1981; PIHLSTROM et al., 1983; KALDAHL et al., 1996; ROSLING et al., 2001). A maioria dos estudos estratificavam as sondagens iniciais em: profundidade rasa (1 a 3mm), média (4 a 6mm) e profunda (>7mm). Estes dados justificam que raspar e aplainar raízes em bolsas inicialmente rasas demonstrou reduções em profundidade de sondagem de 0,15 a 0,62mm; para bolsas inicialmente médias as reduções foram de 0,40; -1,70mm e bolsas de profundidade inicial altas, as reduções foram de 0,99- 2,80mm (Hung e Douglass, 2002). Na pesquisa de Ioannou et al. (2009), encontraram valores de média de redução de 0,88mm, com uma recuperação mais pronunciada nas bolsa de profundidade média. Neste estudo foram obtidas médias de profundidades de bolsas pré terapia de 3,05mm e após o tratamento estas bolsas foram reduzidas para em média 2,68mm, representando uma redução de 0,37mm ($p < 0,01$), dados que estão em concordância com a literatura mundial e que demonstram a eficácia da terapia mecânica. Analisando seis faces de cada dente (V, MV, DV, P, MP e DP), as faces disto palatinas foram as de maiores médias iniciais de profundidades com 3,43mm, sugerindo que por serem áreas de maior dificuldade de higienização por parte do paciente são mais propensas aos efeitos deletérios da doença periodontal sobre as estruturas de suporte do elemento dental. As faces disto vestibulares foram as que tiveram maiores médias de redução de profundidade e efetividade de tratamento com 0,56mm de redução ($p < 0,01$).

Schleget Bregenzer et al. (1998) analisaram indivíduos com doença periodontal e altas médias de profundidade de sondagem (6.7mm), enquanto Colombo et al. (2002) obtiveram médias de 3,3mm de profundidade de bolsa e sítios com visibilidade de placa (70%) e supuração (14%). Em 29 indivíduos com periodontite crônica analisados demonstraram médias iniciais de bolsa de 5.6mm com redução para 3.9mm ($p < 0.01$).

Os índices de sangramento gengival eram de 76% dos sítios pré terapia e reduziram para 51,9% após o tratamento ($p < 0,05$) para Takamatsu et al 1999. Nesta pesquisa inicialmente 95% dos pacientes eram positivos para sangramento e após a terapia obtivemos uma redução de 73,7% dos indivíduos sangrantes ($p < 0,01$).

Na análise da presença de cálculo 80% dos pacientes eram positivos para a presença de cálculo, e após a terapia tivemos uma redução de 50% nos índices de presença de cálculo ($p < 0,08$). São valores estatisticamente significativos que justificam a terapia mecânica como forma terapêutica eficaz na redução do processo inflamatório periodontal.

Apesar das limitações, a cultura microbiológica tem sido muito utilizada para isolamento e identificação dos patógenos periodontais. Posteriormente a reação da polimerase em cadeia (PCR) surgiu como tecnologia de diagnóstico rápida e moderna, suprimindo limitações de métodos baseados em cultura e sorologia, sobretudo, em detrimento ao crescimento de microrganismos fastidiosos ou que exigem atmosferas e nutrientes especiais para crescimento *in vitro*. Atualmente, os métodos moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de patógenos periodontais (AVILA-CAMPOS et al., 1999; SLOTS et al., 1995).

De acordo com a literatura, e os avanços clínicos e microbiológicos sobre as doenças periodontais, as espécies bacterianas mais frequentemente pesquisadas são: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinomyces actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivallis*, *Prevotella intermédia*, *Tannerella forsythia* (*T.forsythensis*), *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola*. Em estudos conduzidos por Ali et al (1996, 1997) em sítios com profundidade $>6\text{mm}$ e entre 4-5mm em 75% dos pacientes foram encontrados os microrganismos *P.gingivallis* em maior frequência, seguido por *P.intermedia*, *F.nucleatum* e *A.actinomycetemcomitans*; além disso em 51% dos pacientes com periodontite crônica foi observada a presença de *A.actinomycetemcomitans* enquanto apenas 9,5% de pacientes saudáveis possuíam esta bactéria. Mullaly et al. (2000) encontraram taxas de 19% de *A.actinomycetemcomitans*, enquanto Avilla-Campos e Velasquez-Melendez (2002) encontraram taxas de 90% de *A.actinomycetemcomitans* em pacientes comprometidos periodontalmente. Taxas idênticas de 33% foram encontrados por Aimetti, Roman e Nessi (2007) e por Krigar et al (2007) e 42% por Ready et al 2009.

No nosso estudo, *A.actinomyctencomitans* foi detectados em 30% dos pacientes portadores de periodontite crônica em momento clínico pré-terapia.

Em relação à redução destes microrganismos após terapia periodontal mecânica, a literatura aponta estudos que confirmam a redução microbiana, entretanto alguns autores não observam alteração: Takamatsu (1999) avaliando pacientes com periodontite crônica submetidos a tratamento e acompanhamento periodontal, observou taxas de 16,4% de A.a no momento pré-terapia e redução para 8,7% na detecção destes microrganismos no momento pós terapia, também utilizando metodologia molecular de PCR. Doung-udomdacha et al (2001) avaliando 50 pacientes periodontais crônicos não observou valores significativos de redução da espécie *A.actinomyctemcomitans*. De acordo com as observações de Tong et al (2003) a detecção de *A.actinomyctencomitans* foi reduzida de 68% para 56% após o tratamento periodontal, sendo que 3 meses após a terapia mecânica o microrganismo não foi identificado em 5 dos sítios originalmente positivos e ainda no fim de 12 meses, 3 dos sítios inicialmente positivos para Aa também já não possuíam mais este patógeno. Segundo estes autores houve ainda um paciente que originalmente era negativo para A.a e após 12 meses apresentou positividade para este microrganismo. Para Ioannou et al 2009, a erradicação de A.a através da terapia mecânica é difícil, uma vez que este patógeno possui uma característica de se alojar nos tecidos moles, sendo necessário a terapêutica medicamentosa antibiótica associada a terapia mecânica para seu combate. Neste estudo ao avaliarmos 20 pacientes periodontalmente comprometidos e ao considerar-se a detecção de *A.actinomyctencomitans* inicial (30%) todos estes pacientes foram negativos para tal microrganismo ao final do período de tratamento. Entretanto, apenas um paciente que inicialmente era negativo tornou se positivo após a terapia, dado semelhante ao encontrado por Tong et al (2003). Obtivemos um índice de sucesso de 100% da terapia no combate deste microrganismo, valor superior aos encontrados na literatura de referência. Ao cruzarmos os dados de redução desta espécie com redução de profundidade de bolsa subgingival, obtivemos uma média de 0,39 mm de redução de bolsas quando da eliminação da *A.actinomyctemcomitans*. Com base nestes dados e de acordo com valores obtidos a partir da literatura mundial, observamos uma efetiva redução do A.a através da terapia mecânica em pacientes periodontais crônicos, mesmo sendo este patógeno

predominantemente de periodontites agressivas do adulto jovem. Justifica-se o emprego de raspagem e aplainamento radicular no combate a este microrganismo.

Nas pesquisas de Chaves et al. (2000) e Doung-udomdacha et al. (2001) a presença de *Porphyromonas gingivalis* após a terapia está significativamente associado com a perda óssea progressiva, com aumento da profundidade de bolsa e perda de inserção, mas para estes mesmos autores, após a terapia mecânica encontramos índices de 86% de redução numérica deste patógeno. Takamatsu et al. (1999) obtiveram *P.gingivalis* em 65,4% dos sítios pré terapia e após o tratamento somente 22,1% destes sítios ainda possuíam este microrganismo. Carvalho et al. (2005) analisando bactérias do complexo vermelho, o qual se insere *P.gingivalis*, obtiveram amostras iniciais de 18,4% destes patógenos pré terapia com redução para 3% destes em 90 dias após tratamento radicular. Del Peloso Ribeiro et al. (2008) observou taxas de 72,5% e Ready et al. (2009) de 78% de *P.gingivalis* no biofilme subgingival de portadores de periodontite crônica pré tratamento, estas taxas foram significativamente reduzidas para índices de 46% após 30 dias da terapia mecânica. Os números de nossa pesquisa demonstraram taxas de 65% de P.g anterior ao tratamento, valores muito aproximados aos encontrados pelos autores citados anteriormente em análises pré tratamento e obtivemos índices de redução de 15% após tratamento, semelhante ao índice de redução de P.g do estudo de Carvalho et al. (2005) .Encontramos ainda valores de 0,58mm como médias de redução de profundidade de bolsa subgingival quando da eliminação de *Porphyromonas gingivallis*. Estas altas médias de redução de bolsa comprovam agressividade deste microrganismo, e que mesmo com uma pequena redução desta espécie nos pacientes, já obtivemos uma sensível melhora clínica de um dos principais sintomas da doença periodontal. Apesar do sucesso na redução da *P.gingivallis* e na recuperação clínica, estes valores demonstram uma re-colonização subgingival desta espécie após 90 dias de terapia, dados confirmados pela literatura mundial, que também afirma que o período de 30 dias após a terapia é o período de maior diminuição numérica desta espécie bacteriana. Nosso estudo mais uma vez, apoiado pela literatura mundial, corrobora a terapia mecânica como método efetivo de diminuição e ou erradicação da espécie P.g em bolsas subgingivais de doentes periodontais crônicos, principalmente nos primeiros 30 dias

após este tratamento, sendo também o período de maior recuperação dos sintomas clínicos causados por esta espécie.

Em estudos de análise da espécie *Prevotella intermédia*, Bong-Kyu et al. (2000), Chaves et al. (2000) e Mullally et al. (2000) encontraram valores de 71%, 50% e 61,9% respectivamente de prevalência deste patógeno em pacientes com periodontite crônica. Avila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002) observaram taxas de 84% de *P.intermedia* em portadores de periodontite. Taxas aproximadas (77%) foram encontradas por Boutaga et al. (2005) em pacientes com periodontite não tratada. Quando se correlaciona terapia e redução de prevalência desta espécie, citamos Chaves et al (2000) que conseguiu em seu estudo uma redução numérica em *P.intermedia* após 1 mês da terapia mecânica, embora as taxas tenham aumentado em análises de 3 meses após terapia e em 6 meses após tratamento encontramos valores semelhantes aos pré terapia. Estes dados corroboram a hipótese de re-colonização bacteriana subgingival após longos períodos de terapia. Em nosso estudo as taxas de *P.intermedia* encontradas foram de 50% dos pacientes nas amostras pré terapia, taxas que estão em sintonia com os valores encontrados por outros autores que embasaram este estudo. Após a terapia, obtivemos uma significativa redução para apenas 10% dos pacientes portadores da *Prevotella intermédia*. Estes valores representam uma taxa de 80% de sucesso da terapia mecânica em efetividade contra a esta bactéria. Para a análise de redução de bactéria e melhoria de sintomatologia clínica, a redução média de profundidade de bolsa foi de 0,07mm nos pacientes que apresentaram redução da *P.intermedia*. Com base nestes resultados, nosso estudo está em consonância com a literatura mundial, comprovando que a terapia mecânica é um método eficaz na redução desta espécie, e nas análises pós tratamento no período de 3 meses, ao contrário do encontrado por Chaves et al. (2000), nossos valores de *P.intermedia* continuaram inferiores aos encontrados na análise pré terapia, embora não tenhamos feito uma coleta e análise de amostra no período de 1 mês após a terapia, para avaliarmos se neste período houve uma redução ainda mais significativa nesta espécie quando comparada aos 3 meses após tratamento.

Quando analisamos o *Campylobacter rectus*, podemos observar nos estudos de Mullally et al. (2000) taxas de 92,8% de presença de *Campylobacter rectus* em portadores de doença periodontal. Avila-Campos e Velásquez-Meléndez

(2002) detectaram através da reação da polimerase em cadeia o *C.rectus* em 80% dos portadores de periodontite e em 48% dos indivíduos saudáveis periodontalmente. Cortelli Jr. (2003) encontrou taxas de 48% para *C.rectus* em doentes periodontais. Estes valores demonstram que o *C.rectus* é um microrganismo altamente prevalente em doentes periodontais e até mesmo em pacientes saudáveis periodontalmente (AVILA-CAMPOS E VELÁSQUEZ-MELENDÉZ, 2002). Nossa pesquisa demonstrou taxas de 95 % de *C.rectus* nos pacientes analisados pré-terapia, valores altos que demonstram a predominância deste patógeno em indivíduos periodontalmente comprometidos. Após a terapia mecânica, conseguimos um índice de apenas 5,3% de redução deste patógeno, demonstrando ser este microrganismo altamente pertencente à flora bacteriana oral nativa e que sofre um exponencial aumento em casos de doença periodontal. Quando comparamos a redução de *C.rectus*, e cruzamos com médias de redução de profundidade de bolsa, obtivemos médias de redução de 0,86mm, valores que o colocam como o patógeno que apresentou melhor resposta clínica quando eliminado. Sabemos que o *C.rectus*, tal como o *F.nucleatum*, é um patógeno não muito agressivo ao sistema periodontal, mas que atua proporcionando um meio favorável para a colonização de patógenos mais agressivos (ABIKO, Y et al, 2010), talvez por isto, mesmo quando reduzido em pequenas quantidades, obtivemos uma significativa e positiva resposta clínica. Ainda de acordo com nossos resultados e com as pesquisas mundiais concluímos que o *C.rectus* é também um patógeno pouco responsivo a terapia mecânica quanto a sua redução quantitativa e que por ser um microrganismo pertencente à flora oral pode rapidamente re-colonizar o ambiente subgengival após a raspagem e alisamento radicular.

As espécies bacterianas produtoras de pigmento negro são importantes agentes no desenvolvimento e progressão da doença periodontal, sendo a *Prevotella nigrescens* a mais importante. Para Schlegel Bregenzler et al.. (1998) analisando pacientes com doença periodontal, constatou que 10% destes apresentavam a *P.nigrescens*, embora Mullally et al (2000) encontrou valores de 62% de pacientes portadores de *P.nigrescens* em um grupo de doentes periodontais crônicos. Colombo et al (2002), conseguiu obter uma correlação de altos valores desta espécie em indivíduos com periodontite não tratada e com sintomas avançados desta doença. Nesta pesquisa, encontramos 11 pacientes portadores de

Prevotella nigrescens pré terapia (55%), e após o tratamento houve uma recuperação de 6 destes pacientes que tornaram se negativos para este patógeno evidenciando valores de 54% de redução destes microrganismos pela terapia periodontal mecânica. Foram encontradas médias de 0,28mm de redução de bolsa quando a *P.nigrescens* foi reduzida nos doentes periodontais. Com nossos resultados semelhantes a literatura mundial, podemos concluir que para a bactéria *P.nigrescens*, a terapia radicular é um importante e efetivo tratamento no combate a esta espécie e positivo na recuperação dos danos causados por este microrganismo as estruturas periodontais.

Fusobacterium nucleatum é um patógeno oral comumente encontrado em altas taxas, independente do quadro de saúde ou doença periodontal experimentado pelos pacientes. Avila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002), avaliaram a presença do *F.nucleatum* em indivíduos saudáveis e comprometidos periodontalmente, encontrando valores de 92% e 96% respectivamente, resultado semelhante ao de Boutaga et al. (2005) que avaliaram a microbiota subgengival de doentes periodontais crônicos e encontraram taxas de 98% para patógenos do gênero *Fusobacterium*. Para Colombo et al. (2002) o *F.nucleatum* esta intimamente implicado com portadores de periodontite crônica com maiores médias de profundidades de bolsa. Nesta pesquisa, os números de prevalência deste patógenos são extremamente semelhantes ao da literatura mundial, uma vez que encontrou se o *F.nucleatum* em 95% dos pacientes portadores da periodontite pré tratamento, e mesmo após a terapia mecânica os valores de detecção deste microrganismo continuaram altos, o que implica em uma inefetividade na terapia mecânica na erradicação deste patógeno e ou a rápida re-colonização desta bactéria na cavidade oral após a terapia. Como não tivemos redução desta espécie nos nossos pacientes, também não tivemos redução das médias de profundidade de sondagem, o que confirma a afirmação de Colombo et al 2002, de que o *F.nucleatum* está intimamente relacionado com maiores médias de profundidade de bolsa e sua não redução mantiveram estas profundidades de bolsas inalteradas. Segundo Abiko et al. 2010, o *F.nucleatum* atua no biofilme subgengival como um agente que proporciona uma maior susceptibilidade do meio subgengival para a colonização de outras espécies mais agressivas, com isto atuando indiretamente nos danos as estruturas de suporte periodontal, embora ele mesmo em altas

concentrações ,propriamente, não seja um dos microrganismos mais agressivos as estruturas periodontais.

A espécie *Treponema denticola* juntamente com *Porphyromonas gingivallis* e *Tannerella forsythia* formam o complexo vermelho. Grupo de bactérias implicadas na evolução da doença periodontal e com características de alta agressividade e destruição ao sistema de suporte periodontal. Em pesquisa de Schlegel Bregenzler et al. (1998) analisando doentes periodontais crônicos foram encontradas taxas de 70% de *T.denticola* avaliados por método de cultura, valores aproximados aos 88% encontrados por Mullally et al. (2000) avaliando indivíduos comprometidos periodontalmente. Takeuchi et al. (2001), avaliou *T.denticola* em pacientes com periodontite agressiva, crônica e indivíduos saudáveis periodontalmente encontrando valores de 73,7%, 93,8% e 5% respectivamente. Estes dados demonstram as altas taxas deste patógeno em ambos os quadros de periodontite e evidenciam que este microrganismo está intimamente envolvido com a destruição periodontal, sendo incomum a presença dele em estágios de saúde periodontal. Em nossa pesquisa, obtivemos uma alta frequência de detecção da *T.denticola* em 65% dos pacientes comprometidos periodontalmente, valores semelhantes aos encontrados na literatura mundial (SCHLEGET-BREGENZER et al, 1998, TAKEUCHI et al. 2001). Após a terapia conseguiu se uma redução de 61,5% destes patógenos, comprovando a eficácia da terapia mecânica na redução desta bactéria e por consequência a diminuição dos efeitos patogênicos causados por esta bactéria sobre o ligamento periodontal (redução média de 0,36mm de profundidade de bolsa). Este índice de efetividade da terapia mecânica na redução da *T.denticola*, corroborado pelas pesquisas mundiais, justifica o uso desta terapêutica no combate a este agressivo patógeno do sistema periodontal.

Eikenella corrodens é uma bactéria também associada à doença periodontal, com menor agressividade as estruturas dentárias, age em simbiose com os principais patógenos periodontalmente destrutivos, e propiciando um meio mais adequado a proliferação de patógenos anaeróbios estritos. Mullally et al (2000) encontrou taxas de 42% de *E.corrodens* em doentes periodontais. Encontramos taxas de 90% de *E.corrodens* nos pacientes periodontais crônicos, e conseguimos redução de 22% nestas taxas após o tratamento mecânico. Também obtivemos redução de 0,12mm de média de profundidade de bolsa subgengival quando

cruzamos os dados clínicos com a redução da *Eikenella corrodens*. Novamente temos um caso de espécie bacteriana não muito agressiva ao sistema periodontal, mas que age tornando o meio subgengival propício a colonização de espécies mais agressivas (ABIKO et al 2010). A terapia mecânica, baseada nos valores de nossa pesquisa e nas referências que embasam este estudo, torna se o principal método para combater estes microrganismos que atuam em simbiose para a destruição do sistema periodontal.

O periodontopatógeno *Bacteroides Forsythus* (TANNER, 1986), é atualmente chamado de *Tannerella forsythia* (SAKAMOTO et al, 2002). Este microrganismo é um importante patógeno constituinte do Complexo vermelho. Juntamente com *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, possuem atividade marcadamente destrutiva sobre as estruturas do complexo periodontal e está intimamente relacionado com a evolução e cronicidade da doença periodontal. É encontrado em altas taxas em indivíduos com doença periodontal crônica, como descritos por Bong-Kyu et al. (2000) e Boutaga et al. (2005) que relataram a presença de *T.forsythia* em 96% dos sítios doentes analisados em indivíduos portadores de doença periodontal, enquanto que em sítios saudáveis analisados, este patógeno foi registrado em 18% destes. Para Colombo et al. (2002), e Mineoka et al. (2008) os sítios de maiores proporções de *T.forsythia* são também os que possuem maiores profundidades de bolsa a sondagem e sendo encontrados em maiores taxas em pacientes com periodontite crônica não tratada. Para Hui-Weng et al. (2004) as taxas de *T.forsythia* em indivíduos periodontalmente comprometidos são de 60,7% e de 39,6% em indivíduos saudáveis periodontalmente. É um patógeno susceptível ao tratamento periodontal mecânico, onde verificamos redução quantitativa deste, como demonstrado por Ready et al (2009) que em análises de pacientes pré tratamento encontraram taxas de 81% de pacientes portando tal bactéria, sendo que em análise de 2 meses após terapia encontraram *T.forsythia* em 63% dos pacientes e em 6 meses esta taxa continuou em 63%. Nesta pesquisa a análise dos pacientes pré terapia verificou que 10 pacientes (50%) possuíam a *Tannerella forsythia*, e na análise de 3 meses após terapia, 3 tornaram se negativos para esta bactéria, o que representa um sucesso de 30% na efetividade da terapia mecânica para redução da *T.forsythia*. Quando *T.forsythia* estava presente nos pacientes, a média de profundidade de bolsa foi de 3,35mm e quando analisamos

pacientes negativos para a presença de *T.forsythia* a média de profundidade de bolsa foi de 2,74mm, números que corroboram o papel de agressividade deste patógeno as estruturas periodontais. Ainda neste estudo quando analisamos a *T.forsythia* observamos que alguns pacientes que inicialmente mostraram se negativos para este patógeno passaram a apresentá-lo nos exames de 3 meses após a terapia, mas como nossa análise microbiológica é qualitativa e não quantitativa, podemos concluir que não conseguimos erradicar a *T.forsythia*, mas sim diminuir sua concentração numérica e conseqüentemente amenizamos seus efeitos deletérios sobre o periodonto, o que reflete na menor média de profundidade de bolsa nos indivíduos positivos para esta bactéria após o tratamento periodontal. Esta situação pode ser também interpretada por uma nova colonização nestes indivíduos previamente negativos devido a diminuição ou erradicação de outras espécies competitivas com a *T.forsythia*, tornando o meio oral propício para seu crescimento, ou pelo próprio período de tempo e deficiência de uma higienização oral por parte do paciente que levaram a colonização e identificação desta espécie. Para Haffajje et al. (1994) e Papapanou et al. (2002), a *T.forsythia* como as demais bactérias periodontopatogênicas necessitam atingir um limite numérico específico na placa subgengival para apartir daí provocarem a doença periodontal efetivamente, portanto se em nosso estudo conseguimos reduzir esta concentração de *T.forsythia* ou qualquer outro patógeno na placa subgengival, obtivemos sucesso na terapia.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante da metodologia empregada nesta pesquisa e análise estatística dos resultados, pode-se concluir que:

- A terapia periodontal mecânica contribui para a redução dos microrganismos periodontopatogênicos, embora não os erradique.
- Após 3 meses de terapia, é possível a detecção de periodontógenos no ambiente oral, sendo que a flora bucal e a predisposição de cada paciente permitirá possivelmente uma nova manifestação da doença periodontal.
- A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) é um método efetivo na identificação dos patógenos causadores da doença periodontal, podendo ser utilizado como ferramenta definidora de prognóstico e tratamento dos indivíduos periodontalmente comprometidos.
- Alguns pacientes, mesmo não apresentando redução qualitativa de algumas espécies bacterianas, demonstraram significativa melhoria dos sintomas clínicos analisados, o que permite concluir a etiologia multifatorial da doença e a interrelação microbiana.
- A espécie *Porphyromonas gingivallis* quando efetivamente reduzida pela terapia mecânica implica em maior média de redução de profundidade de bolsa subgingival, evidenciando o alto potencial agressivo desta espécie as estruturas periodontais.
- As espécies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermédia* quando reduzidas após terapia, refletem na redução de sangramento e cálculo periodontal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIKO Y. et al. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. **J. Periodontol Res.**, local, v. 45, p. 389-395, 2010.

AIMETTI, M.; ROMAN, F.; NESSI, F. Microbiologic Analysis of Periodontal Pockets and Carotid Atheromatous Plaques in Advanced Chronic Periodontitis Patients. **J Periodontol**, v. 78, n. 9, p. 1718-1723, Sep. 2007.

ALBANDAR, J. M.; LYNGSTADAAS, S. P.; FORHORD, B. PCR primers for the amplification of the 16S rRNA gene of oral bacteria and for the specific identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Eur J Oral Sci**, v. 104, p. 144-147, 1996.

ALI, R. W. et al. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. **J Clin Periodontol**, v. 24, p. 830-835, 1997.

_____. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, v. 23, p. 133-139, 1996.

ARMITAGE, G. C. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, Dec. 1999.

_____. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v. 34, p. 9-21, 2004.

ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v. 11, p. 266-273, 1996.

AVILA-CAMPOS, M. J.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 1-5, 2002.

AVILA-CAMPOS M. J. et al. Arbitrarily primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of *Fusobacterium nucleatum*. **J Periodontol.** v.70, n.10, p.1202-1208, 1999.

AXELSSON, P.; LINDHE J. Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. Results after 6 years. **J Clin Periodontol.** v.8, n.3, p.239-248. 1981.

AXTELIUS, B. et al. Therapy-resistant periodontitis (I). Clinical and treatment characteristics. **J Clin Periodontol**, v. 24, p. 640-645, 1997.

BONG-KYU, C. et al. Detection of Major Putative Periodontopathogens in Korean Advanced Adult Periodontitis Patients Using a Nucleic Acid-Based Approach. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 9, p. 1387-1394, September, 2000.

BOUTAGA, K. et al. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, p. 191-199, 2005.

CADOSCH J. et al. Root surface debridement and endotoxin removal. **J Periodont Res**, v. 38, p. 229-236, 2003.

CARMAN, S. et al. Severe acute bovine viral diarrhea (BVD) in Ontario, 1993-1995. **J. Vet. Diagn. Invest**, v. 10, p. 27-35, 1998.

CARRANZA, F. A. et. al. **Periodontia Clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CARVALHO, L. H. et al. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II – microbiological results. **J Clin Periodontol**, v. 32, p. 406–411, 2005.

CHAMBRONE, L. A.; CHAMBRONE, L. Tooth loss in well maintained patients with chronic periodontitis during long-term supportive therapy in Brazil. **J Clin Periodontol**, v. 33, p.759-764, 2006.

CHAVES E. S. et al .Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. **J Clin Periodontol**, v. 27, p. 897-903, 2000.

CHOL PARK YOO et al. Periodontal bacteria in adult periodontitis. **J Periodontol**, v. 71, n. 9, p. 1387-1394, 2000.

COLOMBO, A. P. V. et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 4, p. 360-369, 2002.

CORTELLI JR. et al. Prevalência de periodontite agressiva em adolescentes e adultos jovens do Vale do Paraíba. **Pesqui Odontol Bras**, v. 16, p. 162-168, 2002.

DEL PELOSO RIBEIRO, E. et al. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 78-798, 2008.

DOUNG-UDOMDACHA, S. et al. A novel closed-tube quantitative-PCR method for enumerating *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Periodont Res**, v. 35, p. 247-258, 2000.

DOUNG-UDOMDACHA S. et al. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella*

intermedia and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. **J Clin Periodontol**, v. 28, p. 437-445, 2001.

GHIZONI, J. S. Avaliação e correlação da doença periodontal com acidente vascular cerebral por meio da identificação e quantificação da *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCR convencional e PCR em tempo real. **Tese Mestrado**, Bauru-USP, 2007.

GOMES, S. C. The effect of a supragingival plaque control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by Real Time Polymerase Chain Reaction. **Journal of Periodontology**, v. 12, p. 2297-2304, 2008.

HAFFAJJE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000**. v. 5, p. 78-111, 1994.

HAFFAJEE, A. D. et al. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. **J Clin Periodontol**. v. 24, p. 767-776, 1997.

HAFFAJEE, A. D.; TORRESYAP, G.; SOCRANSKY, S. S. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1 year results. **J Clin Periodontol**, v. 34, p. 243-253, 2007.

HUI-WENG YANG et al. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in Periodontally Diseased and Healthy subjects. **J. Periodontol**, v. 75, n. 8, p. 165-175, 2004.

HUNG, H. C.; DOUGLAS, C. W. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. **J Clin Periodontol**, v. 29, p. 975-986, 2002.

IOANNOU, I., et al. Hand instrumentation versus ultrasonic debridement in the treatment of chronic periodontitis. a randomized clinical and microbiological trial. **J Clin Periodontol**. V.36, p. 132-141, 2009.

KALDAHL W.B. et al. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. **J Periodontol**. v.67, n.2, p.93-102, 1996.

KENNY, S. K. et al. Clinical responses to mechanical Periodontal Treatment in Chinese Chronic Periodontitis Patients with and without Actinobacillus Actinomycetemcomitans. **J Periodontol**, v. 74, p. 1582-1588, 2003.

KNOWLES W. B. et al. Results of periodontal treatment related to pocket depth and attachment level. Eight years. **J Periodontol**. v. 50, n. 5, p.225-233, 1979.

KRIGAR, D. M. et al. Two Subgingival Plaque-Sampling Strategies Used With RNA Probes. **J Periodontol**, v. 78, p. 72-78, 2007.

KULEKCI, G. et al. Salivary detection of periodontopathic bacteria in periodontally healthy children. **Anaerobe**, v. 14, n. 1, p. 49-54, Feb. 2008.

LINDHE, J. et al. Consensus report: chronic periodontitis. **Ann Periodontol Clin Oral Invest**, v. 4, n. 38, p. 73-81, 1999.

LOE, H.; ANERUD, A. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **J Clin Periodontol**. v. 13, n. 5, p. 431-445, 1986.

LORENTZ, T. C. M. et al. Prospective study of complier individuals under periodontal maintenance therapy: analysis of clinical periodontal parameters, risk predictors and the progression of periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 36, p. 58-67, 2009.

MATULIENE, G. et al. Influence of residual pockets on progression of periodontitis and tooth loss: Results after 11 years of maintenance. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 685-695, 2008.

MINEOKA, T. et al. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. **J Periodontol**. v. 79, n. 4, p. 670-676, 2008.

MOENE, R. et al. Subgingival plaque removal using a new air-polishing device. **J Periodontol**. v. 81, n. 1, p. 79-88, 2010.

MORIKAWA, M. et al. Comparative analysis of putative periodontopathic bacteria by multiplex polymerase chain reaction. **J Periodont Res.**, v. 43, p. 268-274, 2007.

MORILLO, J. M. et al. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **J Periodont Res**, v. 38, p. 518-524, 2003.

MULLALLY, B. H. et al: Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. **J Periodont Res.**, v. 35, p. 232-241, 2000.

NORSKOV-LAURITSEN, N.; KILIAN, M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 2135-2146, set. 2006.

OLIVER, R. C.; BROWN L. J.; LOE, H. Periodontal diseases in the United States population. **J Periodontol**. v.69, n.2, p.269-278. 1998.

PAPAPANOU, P. N.; TEANPAISAN, R.; OBIECHINA, N. S. et al. Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural simple in southern Thailand. **Eur J Oral Sci.** v. 110, p. 345-352, 2002.

PEREZ-CHAPARRO, P. J. et al. Genotypic characterization of Porphyromonas gingivalis isolated from subgingival plaque and blood sample in positive bacteremia subjects with periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 748-753, 2008.

PIHLSTROM B. L. et al. The use of selective media for examining relationships between dental plaque microorganisms and periodontal disease in a large sample clinical investigation. **J Periodontol Res.** v.17, n.5, p.518-520, 1983.

READY, D. et al. Disease severity associated with presence in subgingival plaque of Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Tannerella forsythia, singly or in combination, as detected by nested multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 10, p. 3380-3383, 2008.

ROSLING et al. Longitudinal periodontal tissue alterations during supportive therapy. Findings from subjects with normal and high susceptibility to periodontal disease. **J Clin Periodontol.** v.28, n.3, p.241-249, 2001.

SANZ, M. et al. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. **Eur J Oral Sci**, v. 108, p. 383-92, 2000.

SAKAMOTO M. et al. Reclassification of Bacteroides forsythus (Tanner et al. 1986) as Tannerella forsythensis corrig., gen. nov., comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.** 52, n.3, p.841-849, 2002.

SCHLEGET-BREGENZCR et al. Clinical and microbiological findings in elderly subjects with gingivitis or periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 25, p. 897-907, 1998.

SLOTS J. et al. 1995 Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin Infect Dis**, v.2, p.304-307, 1995.

SOCRANSKY et al. New concepts of destructive periodontal disease. **J Clin Periodontol**. v.11, n.1, p.21-31, 1984.

SPEER, C. et al. Investigations on the Influencing of the Subgingival Microflora in Chronic Periodontitis A Study in Adult Patients during Fixed Appliance Therapy. **J Orofac Orthop**, v. 65, p. 34-47, 2004.

TACHIBANA, M. et al. Prevalence of periodontopathic bacteria on the tongue dorsum of elderly people. **Gerodontology**, v. 23, n. 2, p. 123-126, 2006.

TAKAMATSU, Y.; HE-UMEDA, I. Effect of initial Periodontal Therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J Periodontol**, v. 70, n. 6, p. 1454-1501, 1999.

TAKEUCHI, Y. et al. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 72, n. 10, p. 1354-1363, 2001.

TANNER A. C. Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. **Oral Microbiol Immunol**, v.1, n.1, p.15-22, 1986.

TETSURO M. et al. Site-Specific Development of Periodontal Disease Is Associated With Increased Levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in Subgingival Plaque. **J Periodontol**, v. 79, p. 670-676, 2008.

VAN STEENBERGEN, A. et al. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. **J Clin Periodontol**, v. 23, p. 955-959, 1996.

VAN WINKELHOFF, A. J. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J Clin Periodontol**, v. 29, p. 1023-1028, 2002.

_____. et al . Clonal stability of Porphyromonas gingivalis in untreated periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 35, p.674-679, 2008.

VERNER, C. et al. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, p. 341-346, 2006.

XIMENEZ-FYVIE, L. A. et al. Microbiota of Mexican Subjects With Chronic Periodontitis. **J Periodontol**, v. 77, n. 3, p. 460-471, 2006.

YUAN, K. et al. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. **J Periodontal Res**, v. 36, n. 1, p.18-24, Feb. 2001.

WATANABE K.; FROMMEL T. O. Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans and Treponema denticola detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. **J Clin Periodontol**, v.23, n.3, p.212-219, 1996.

ANEXOS

ANEXO 1

PACIENTE: _____

SEXO: _____

IDADE: _____

DATA: _____

	M	MV	DV	P	MP	DP		M	MV	DV	P	MP	DP
18							38						
17							37						
16							36						
15							35						
14							34						
13							33						
12							32						
11							31						
21							41						
22							42						
23							43						
24							44						
25							45						
26							46						
27							47						
28							48						

ANEXO 2

Bactérias	Presente	Ausente
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		
<i>Prevotella intermedia</i>		
<i>Tannerella forsythia</i>		
<i>Campylobacter rectus</i>		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		
<i>Prevotella nigrescens</i>		
<i>Eikenella corrodens</i>		
<i>Treponema denticola</i>		

ANEXO 3

Resultados descritos – Bactérias encontradas no pré e pós tratamento

AaD* AaA Cruzamento

			AaA		Total
			-	+	
AaD	-	N	13	6	19
		%	92,9%	100,0%	95,0%
	+	N	1	0	1
		%	7,1%	,0%	5,0%
Total		N	14	6	20

Chi-Square Tests(OK)

	Value	P
McNemar Test		,125(a)
N of Valid Cases	20	

a Binomial distribution used.

PgD * PgA Crosstabulation

			PgA		Total
			-	+	
PgD	-	Count	7	2	9
		% within PgA	100,0%	15,4%	45,0%
	+	Count	0	11	11
		% within PgA	,0%	84,6%	55,0%
Total		Count	7	13	20
		% within PgA	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	P
McNemar Test		,500(a)
N of Valid Cases	20	

a Binomial distribution used.

PiD * PiA Crosstabulation

			PiA		Total
			-	+	
PiD	-	Count	10	8	18
		% within PiA	100,0%	80,0%	90,0%
	+	Count	0	2	2
		% within PiA	,0%	20,0%	10,0%
Total		Count	10	10	20
		% within PiA	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	P
McNemar Test		,008(a)
N of Valid Cases	20	

a Binomial distribution used.

TfD * TfA Crosstabulation

			TfA		Total
			-	+	
TfD	-	Count	4	3	7
		% within TfA	40,0%	30,0%	35,0%
	+	Count	6	7	13
		% within TfA	60,0%	70,0%	65,0%
Total		Count	10	10	20
		% within TfA	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	P
McNemar Test		,508(a)
N of Valid Cases	20	

a Binomial distribution used.

CrD * CrA Crosstabulation

			CrA		Total
			-	+	
CrD	-	Count	0	1	1
		% within CrA	,0%	5,3%	5,0%
	+	Count	1	18	19
		% within CrA	100,0%	94,7%	95,0%
Total		Count	1	19	20
		% within CrA	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	P
McNemar Test		1(a)
N of Valid Cases	20	

a Binomial distribution used.

FnD * FnA Crosstabulation

			FnA		Total
			-	+	
FnD	-	Count	1	0	1
		% within FnA	100,0%	,0%	5,0%
	+	Count	0	19	19
		% within FnA	,0%	100,0%	95,0%
Total		Count	1	19	20
		% within FnA	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	P
McNemar Test		1 (a)
N of Valid Cases	20	

a Binomial distribution used.

EcD * EcA Crosstabulation

			EcA		Total
			-	+	
EcD	-	Count	1	4	5
		% within EcA	50,0%	22,2%	25,0%
	+	Count	1	14	15
		% within EcA	50,0%	77,8%	75,0%
Total		Count	2	18	20
		% within EcA	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	P
McNemar Test		,375(a)
N of Valid Cases	20	

a Binomial distribution used.

PnD * PnA Crosstabulation

			PnA		Total
			-	+	
PnD	-	Count	6	6	12
		% within PnA	66,7%	54,5%	60,0%
	+	Count	3	5	8
		% within PnA	33,3%	45,5%	40,0%
Total		Count	9	11	20
		% within PnA	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	P
McNemar Test		,508(a)
N of Valid Cases	20	

a Binomial distribution used.

TdD * TdA Crosstabulation

			TdA		Total
			-	+	
TdD	-	Count	7	8	15
		% within TdA	100,0%	61,5%	75,0%
	+	Count	0	5	5
		% within TdA	,0%	38,5%	25,0%
Total		Count	7	13	20
		% within TdA	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	P
McNemar Test		,008(a)
N of Valid Cases	20	

a Binomial distribution used.