

Aline Martucci Geraldês

**Ocorrência de *Porphyromonas gingivalis* na
microbiota bucal de pacientes submetidos à
radioterapia para tratamento de lesões
malignas de cabeça e pescoço.**

Araçatuba - SP
2010

Aline Martucci Geraldles

**Ocorrência de *Porphyromonas gingivalis* na
microbiota bucal de pacientes submetidos à
radioterapia para tratamento de lesões
malignas de cabeça e pescoço.**

Trabalho de Conclusão de Curso como
parte dos requisitos para a obtenção
do título de Bacharel em Odontologia
da Faculdade de Odontologia de
Araçatuba, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti
Jardim Junior

Araçatuba - SP
2010

Agradecimentos

À Deus, na sua imensa misericórdia em nos conceder a vida e a oportunidade de fazer aquilo que gostamos.

Ao Prof. Elerson Gaetti Jardim Júnior, pela dedicação, determinação, disciplina e empenho neste trabalho e por não medir esforços em transmitir sua incomensurável sabedoria.

Ao meu pai, José Carlos, exemplo de amor e dedicação, sendo praticamente pai e mãe ao mesmo tempo. Obrigada por tudo.

À minha mãe, Maria (*in memoriam*), que mesmo não estando aqui, sei que guia meus passos em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã Fernanda, amiga, confidente e companheira de todos os momentos.

Aos pós-graduandos que ajudaram na execução do material clínico do projeto.

Às estagiárias da Disciplina de Microbiologia por todo o auxílio.

À FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio e pela possibilidade de concretizar este projeto.

“Não viva para que a sua presença seja notada,
mas para que a sua falta seja sentida”. **Bob Marley**

GERALDES, A.M. **Ocorrência de *Porphyromonas gingivalis* na microbiota bucal de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de lesões malignas de cabeça e pescoço.** Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

Resumo

A utilização da radioterapia no tratamento das lesões malignas de cabeça e pescoço tem tido resultados favoráveis, mas seus efeitos sobre as glândulas salivares e outros tecidos bucais podem criar condições favoráveis para a implantação e proliferação de microrganismos bucais. O presente estudo avaliou a ocorrência de *Porphyromonas gingivalis* na microbiota bucal de pacientes oncológicos que fizeram uso de radioterapia (RT) de cabeça e pescoço através de cultura, PCR e real-time PCR. Após os exames clínicos bucais, amostras de saliva, biofilme e superfícies de mucosas bucais foram coletadas em diferentes momentos durante o tratamento (antes da radioterapia, 15-22 dias após o início da radioterapia, imediatamente após o final da RT, 30 dias após a RT, 6 meses após a RT). Os espécimes coletados foram cultivados em ágar sangue suplementado com hemina, menadiona e sangue desfibrilado de cavalo. A identificação dos isolados foi realizada por “kits” comerciais. A seguir, a susceptibilidade a antimicrobianos, bem como a tipagem do gene *fimA* foram determinados. Os pacientes irradiados logo após o início da radioterapia desenvolvem severa mucosite, dermatite, disgeusia, xerostomia e, em menor extensão, candidose bucal. Uma elevada ocorrência desse anaeróbio em amostras de pacientes com periodontite e, em menor extensão, gengivite foi observada. A prevalência e populações de *P. gingivalis* aumentaram significativamente após o início da radioterapia e assim se mantiveram, de forma mais ou menos estável, ao longo do período avaliado, sendo que a distribuição e as populações desse anaeróbio mostraram correlação positiva com a xerostomia. Os isolados foram sensíveis ou moderadamente sensíveis a todos os antimicrobianos e a radioterapia não alterou as proporções entre os diferentes genótipos de *P. gingivalis* de acordo com o gene *fimA*.

Palavras- chave: Radioterapia. *Porphyromonas gingivalis*. PCR.

GERALDES, A. M. **Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* in the oral microbiota of patients undergoing radiotherapy for treatment of malignant head and neck lesions.** Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

Abstract

Radiotherapy is employed for the treatment of head and neck cancer with favorable results. However, the side effects of radiation on salivary glands and other oral tissues may create favorable conditions for the establishment and proliferation of oral microorganisms. This investigation evaluated the occurrence of *Porphyromonas gingivalis* in the oral microbiota of patients undergoing radiotherapy for treatment of head and neck cancer. After clinical examinations, samples of saliva, dental biofilm and surfaces of oral mucosa were collected, and this procedure was performed at different moments during treatment, as well as 6 months after the conclusion of radiotherapy. The presence of these anaerobes was carried out through culture using agar supplemented with hemin, menadione and defibrillated horse blood. It was verified and identification of isolates was performed by commercial kits. Next, the antimicrobial susceptibility and typing of the *fimA* gene were determined. Patients irradiated after the start of radiotherapy developed severe mucositis, dermatitis, dysgeusia, xerostomia and to a lesser extent, oral candidiasis. A high occurrence of anaerobic samples from patients with periodontitis and to a lesser extent, gingivitis was observed. The prevalence and populations of *P. gingivalis* increased significantly after the start of radiotherapy and remained so, more or less stable throughout the study period, and the distribution and populations of anaerobic showed positive correlation with xerostomia. The isolates were susceptible or moderately susceptible to all antimicrobials and radiotherapy did not alter the proportions between the different genotypes of *P. gingivalis* in accordance with the *fimA* gene.

Keywords: Radiotherapy. *Porphyromonas gingivalis*. PCR.

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de PCR convencional.	20
Tabela 2 -	Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de Real-Time PCR.	21
Tabela 3 -	Iniciadores específicos utilizados nos ensaios para genotipagem do gene <i>fimA</i> .	24
Tabela 4 -	Alterações bucais observadas ao longo e após a radioterapia.	29
Tabela 5 -	Ocorrência e severidade da mucosite associada à radioterapia para tratamento de câncer de cabeça e pescoço.	30
Tabela 6 -	Ocorrência de <i>P. gingivalis</i> na microbiota bucal de pacientes que seriam submetidos à radioterapia.	31
Tabela 7 -	Ocorrência de <i>P. gingivalis</i> na microbiota de pacientes após a radioterapia.	31
Tabela 8 -	Ocorrência de <i>P. gingivalis</i> na microbiota dos pacientes, 30 dias após a radioterapia.	32
Tabela 9 -	Ocorrência de <i>P. gingivalis</i> na microbiota dos pacientes, 6 meses após a radioterapia.	32
Tabela 10 -	Ocorrência de <i>P. gingivalis</i> no sulco gengival de pacientes com diferentes condições de saúde periodontal ao longo do tratamento radioterápico.	33

Tabela 11 -	População de <i>P.gingivalis</i> em diferentes sítios anatômicos e saliva, em diferentes momentos do estudo, segundo dados obtidos através de Real-Time PCR.	34
Tabela 12 -	Resistência de 93 isolados de <i>P. gingivalis</i> obtidos de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento do câncer de cabeça e pescoço.	35
Tabela 13 -	Iniciadores específicos utilizados nos ensaios para genotipagem do gene <i>fimA</i> de isolados obtidos ao longo de estudo e das amostras de biofilme subgengival positivas para esse anaeróbio.	36

Sumário

1- Introdução e justificativa	10
2- Objetivos	13
3- Material e Métodos	14
4- Análise Estatística	25
5- Resultados	26
6- Discussão	37
7- Conclusões	46
8- Referências	47
Anexos	

1. Introdução e Justificativa

A radioterapia bem como procedimentos cirúrgicos vêm sendo utilizados no tratamento das lesões malignas de cabeça e pescoço, com melhora significativa da taxa de sobrevida dos pacientes. Entretanto, vários são os efeitos colaterais dessas modalidades terapêuticas, em particular a radioterapia, atingindo, principalmente, mucosas, ossos, glândulas salivares, dentes, estruturas vasculares e neuronais, limitando a qualidade de vida do paciente e comprometendo a adesão desse último ao tratamento de eleição (JHAM e FREIRE, 2006). Além desse aspecto, a incidência dessas reações, como xerostomia e mucosite, é dependente da dose/frequência da radioterapia, local irradiado, idade, volume de tecido irradiado e condições clínicas do paciente e dos tratamentos associados (BENSANDOUN et al., 2001). As manifestações clínicas dos efeitos deletérios da radioterapia podem ser agudas (durante a própria terapia ou nas semanas subseqüentes) ou crônicas, meses ou anos após a radioterapia (SPETCH et al., 2002).

Infelizmente, esses efeitos parecem se exacerbar em pacientes com condições financeiras precárias, que pouco podem fazer para adaptar sua dieta e rotina às condições e privações que o tratamento acaba por impor.

Dentre essas alterações associadas à irradiação, destaca-se a mucosite, a qual é uma das mais prevalentes e sérias reações adversas da radioterapia, atingindo de 40% a 100% dos pacientes (FIDLER et al., 1996; VENESS et al., 2006), causando extremo desconforto e comprometendo a aceitação, continuidade (SPETCH et al., 2002) e intensificação do tratamento radioterápico (DUNCAN et al., 2005). Essa condição pode criar áreas ulceradas, além de dificultar a nutrição e facilitar a implantação de processos infecciosos secundários, locais ou sistêmicos (FIDLER et al., 1996; BENSANDOUN et al., 2001), causados geralmente por microrganismos oportunistas (EPSTEIN et al., 2001), como leveduras e bastonetes Gram-negativos (REDDING et al., 2004; JHAM et al., 2007), os quais podem exacerbar a agressão aos tecidos do hospedeiro, além de originar potentes respostas inflamatórias (SPIJKERVET et al., 1990).

A osteorradionecrose, normalmente associada à mucosite, é a principal enfermidade freqüentemente ligada à radioterapia, podendo estar ou não

infectada e dar origem a fraturas (MONTEIRO et al., 2005). Nesses casos, a presença de seqüestro ósseo e ulceração levam à infecção secundária, a qual pode se disseminar à distância e vir a comprometer as condições de saúde do paciente. Entretanto, estudos moleculares, evidenciaram que a osteorradionecrose pode ser, de fato, causada diretamente por microrganismos em pacientes irradiados (STORE et al., 2005a; STORE et al., 2005b; HANSEN et al., 2006b).

Entre os principais fatores que corroboram para o desenvolvimento de infecções secundárias, durante e após a radioterapia, destacam-se os efeitos da radiação sobre as glândulas salivares, reduzindo o fluxo salivar, alterando a composição da saliva e, conseqüentemente, sua capacidade protetora, reduzindo o pH do biofilme (CERCHIARI et al., 2006), criando condições favoráveis para a implantação e proliferação de microrganismos bucais (SPOLIDORIO et al., 2001), além de bactérias exógenas ao ambiente bucal (LEUNG et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2003). Contudo, não são conhecidos os efeitos da xerostomia, particularmente quando associada à radioterapia, sobre a microbiota anaeróbia obrigatória da cavidade bucal, a qual constitui a principal fonte de microrganismos associados a processos infecciosos na região de cabeça e pescoço, além de infecções no próprio periodonto (BOUTAGA et al., 2007; WU et al., 2007).

Como tratamento radioterápico ocorre uma significativa redução da perfusão sanguínea dos tecidos irradiados, levando a uma progressiva redução da oxigenação tecidual, bem como dos mecanismos de defesa específicos e inespecíficos de defesa do hospedeiro. Essas alterações vasculares podem reduzir o potencial de óxido-redução tecidual, criando condições para a implantação de microrganismos anoxibiontes e/ou outros originários da própria cavidade bucal, em particular do sulco gengival e bolsas periodontais (D'AIUTO, 2007), conseqüentemente desenvolvendo infecções secundárias e invadindo os planos teciduais mais profundos, principalmente os que envolvem tecido ósseo (VISSINK et al., 2003).

Entre os microrganismos anaeróbios obrigatórios bucais, destaca-se a espécie *Porphyromonas gingivalis*, pela sua participação no desenvolvimento das periodontites laterais, infecções endodônticas, abscessos agudos de

origem odontogênica e não odontogênica, anginas e celulite facial, além de ampla gama de fatores de virulência, que incluem proteases fimbriais e não fimbriais, endotoxina, liberação de peptídeos imunomoduladores, capacidade de adesão e invasão celular, dentre outros fatores de virulência (FENG & WEINBERG, 2006).

A prevenção e tratamento dos efeitos colaterais da radioterapia são controversos, existindo vários esquemas terapêuticos, que esbarram no desconhecimento da patogênese dessa condição e da microbiota a ela associada (OKUNO et al., 1997; BENSANDOUN et al., 2001; WORTHINGTON et al., 2004). Dentre esses esquemas destacam-se os usos de vitaminas, oxigênio hiperbárico, antibióticos, anti-sépticos, prostaglandinas sintéticas, extratos vegetais, soluções de sais e analgésicos, isoladamente ou em associação (OKUNO et al., 1997; BENSANDOUN et al., 2001; ARORA et al., 2005; DUNCAN et al., 2005; VENESS et al., 2006), mas esses procedimentos são paliativos (EPSTEIN et al., 2001).

Porém, a maioria desses protocolos não atinge a problemática da infecção secundária (EPSTEIN et al., 2001), de forma que inexistem protocolos preventivo ou terapêutico universalmente reconhecidos (VENESS et al., 2006). Dessa forma, existe a necessidade de estudos sobre os fatores associados com a ocorrência de mucosite e os procedimentos adequados para controlá-la ou preveni-la (VENESS et al., 2006).

A identificação e o isolamento de *Porphyromonas gingivalis* constituem procedimentos que requerem cuidados ligados às exigências nutricionais e fisiológicas desse anaeróbio, não constituindo rotina na grande maioria dos laboratórios clínicos em nosso país, o que contrasta com a importância que esse microrganismo apresenta para a odontologia. Os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), é uma forma importante na identificação das espécies microbianas bucais como diagnóstico molecular, sobretudo para microrganismos que exigem rebuscadas condições de cultivo, além de colaborar na compreensão das inter-relações entre essa microbiota e seu hospedeiro.

2. Objetivos

Em função do papel desempenhado por *P. gingivalis* nas infecções de cabeça e pescoço, bem como a importância da radioterapia como instrumento do tratamento de pacientes irradiados e a severidade das complicações associadas a esse tratamento, o objetivo do presente projeto foi avaliar a ocorrência e participação desse microrganismo anaeróbio obrigatório na microbiota bucal de pacientes irradiados, englobando os domínios do biofilme subgengival, supragengival, mucosas e saliva.

Posteriormente, tendo concluído a proposta inicial, optou-se pela realização de testes de susceptibilidade a antimicrobianos mais empregados no tratamento das infecções de cabeça e pescoço e/ou associadas com microrganismos anaeróbios, bem como a genotipagem, por PCR, do gene *fimA*, associado com a virulência dessa espécie microbiana.

3. Material e Métodos

Esse projeto foi, em todas as suas etapas, executado em associação com o projeto FAPESP 2008/53296-6, executado, sob a mesma orientação, pela graduanda Moriel Evangelista Melo.

Os procedimentos clínicos e laboratoriais do presente estudo receberam a colaboração e foram acompanhados de alunos de doutorado e mestrado em Estomatologia, periodontistas e radiologistas, outros alunos de iniciação científica, bem como de pesquisadores do Centro de Oncologia Bucal da FOA-UNESP, do laboratório de matemática e estatística da Universidade Federal do ABC-UFABC e da Unidade Regional de Radioterapia de Megavoltagem de São José do Rio Preto.

Inicialmente o projeto previa a avaliação da presença do microrganismo alvo em pacientes que estavam concluindo a radioterapia, mas seria impossível avaliar o efeito desse tratamento sobre a participação desse microrganismo na microbiota bucal sem o conhecimento das condições anteriores desses mesmos pacientes. Assim optou-se por proceder a coleta de espécimes clínicos em diferentes momentos da radioterapia e após a radioterapia, como forma de avaliar as modificações que as populações desse microrganismo sofreram ao longo do processo.

3.1. População estudada

Somente os dados dos pacientes que concluíram a radioterapia e permitiram o acompanhamento no período de 6 meses após a conclusão da mesma foram incluídos no estudo. Alguns dados clínicos desses pacientes no período de 12 meses também foram incluídos a título de comparação, mas em função da perda de parcela significativa dos pacientes examinados, foi impossível manter o controle dos pacientes por um período maior.

A amostra do estudo constituiu-se de 50 pacientes submetidos à radioterapia para tratamento das lesões malignas de cabeça e pescoço (inicialmente havíamos proposto 40 pacientes, contudo foi necessário aumentar esse número porque muitos pacientes não concluem adequadamente a radioterapia e a perdas por falecimento ou desistências

são significativas, em função da própria natureza do tratamento utilizado e da doença tratada) de um total de 79 que iniciaram o estudo.

Os pacientes incluídos na amostra autorizaram a participação na pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estavam para começar o tratamento radioterápico, associado ou não à ressecção cirúrgica da lesão, e possuíam o diagnóstico definitivo (histopatológico) de lesão maligna (OKUNO et al., 1997; WIJERS et al., 2001). Os pacientes que utilizavam bifosfonados foram excluídos (HANSEN et al., 2006a), bem como os que receberam medicação tópica ou sistêmica com atividade antimicrobiana nos 3 meses que precederem as coletas para análise da microbiota (WIJERS et al., 2001), que fizeram uso de medicamentos que afetavam o fluxo salivar ou que possuíam doenças sistêmicas debilitantes adicionais (GUEBUR et al., 2004).

Os pacientes receberam de 5040 a 7020 cGy de radiação, fracionados em doses de 180 cGy. e foram acompanhados junto à Unidade Regional de Radioterapia de Megavoltagem em São José do Rio Preto. A radioterapia era realizada através de acelerador linear. A seleção e acompanhamento dos pacientes foram realizados a partir de meados de novembro de 2007, logo após a aprovação do projeto pelo CEP-UNESP, sendo que os pacientes, salvo os que desistiram do tratamento ou vieram a falecer, foram submetidos a exames clínicos por um período de até 6 meses após a radioterapia.

3.2 Exame clínico bucal

3.2.1 Exame clínico das condições periodontais

Um único examinador realizou os exames clínicos periodontais utilizando-se dos critérios do Periodontal Screening and Recording (PSR). O exame foi realizado com o uso de espelho bucal plano, pinça para algodão (Duflex^R), sondas periodontais tipo Williams (Trinity^R) e sondas periodontais (Trinity^R), semelhantes às sondas número 621 da OMS, recomendada pela American Dental Association e American Association of Periodontology. Colocava-se a sonda no sulco gengival, posicionada paralela ao longo eixo

do dente e percorria todas as faces dos dentes presentes. A boca dos pacientes era dividida em seis sextantes.

O maior escore do PSR era registrado para cada um dos sextantes e que, se ausente, era registrado com um X. Os escores podiam variar de 0 a 4. Código 0: ausência de bolsa periodontal, sem sangramento a sondagem, ausência de cálculo e excessos de margens restauradoras. Código 1: ausência de bolsa periodontal, sangramento à sondagem; sem cálculo e excessos nas margens das restaurações. Código 2: ausência da bolsa periodontal, sangramento à sondagem, presença de cálculo supra e/ou subgingival e/ou excessos nas margens de restaurações. Código 3: presença de bolsa de 3,5 a 5,5 mm, necessitando de um exame periodontal complementar apenas do sextante em questão, com medidas de bolsa e nível de inserção e outros, além de tratamento periodontal especializado do sextante. Código 4: presença de bolsa periodontal acima de 5,5mm, o que, por ser considerado periodontite avançada, havia necessidade de se realizar um minucioso exame periodontal convencional de toda boca, medidas de profundidade clínica de sondagem das bolsas periodontais e periodontograma (VAN DER VELDEN et al., 2006) .

A inserção do código (*) no sextante significava a presença de problemas como envolvimento de furca, mobilidade, problemas mucogengivais (perda de gengiva inserida) e retração gengival acima de 3,5mm. Os indivíduos diagnosticados com os códigos 3 e 4 eram submetidos a exame periodontal detalhado. Todos os pacientes receberam palestras individuais sobre instruções de higiene oral. Nesse exame periodontal complementar, eram considerados o índice sangramento gengival (AINAMO e BAY, 1975), presença de calculo supragengival, determinação da profundidade clínica de sondagem e o nível clínico de inserção (RAMFJORD, 1959) e índice de higiene oral.

3.3. Coleta dos espécimes clínicos.

3.3.1 Saliva e biofilme supragengival

As coletas de biofilme supragengival e saliva foram realizadas imediatamente antes do exame clínico das condições dentárias dos

pacientes. Para a coleta de saliva, os pacientes eram orientados a não beber, comer ou realizar a higiene bucal uma hora antes da coleta. A coleta foi realizada através de dispositivos denominados Salivettes (Aktiengesellschaft, Nümbrecht, Alemanha), adequados para a captação de saliva em pacientes com níveis variados de xerostomia, que permaneciam na cavidade bucal por 15 segundos e eram centrifugados a 5.000 x g., por 5 minutos.

A seguir, a saliva resultante era transferida para microtubos contendo água ultra-pura Milli Q (Milli-Q Water Purification System, Millipore, Milford, MA, USA), que eram armazenados a -196°C, até a extração do DNA microbiano, e também para frascos contendo meio de transporte VMGA III (MÖLLER, 1966), para minimizar o contato com o oxigênio atmosférico (para cultivo microbiológico), sendo que os espécimes transferidos para esse meio eram submetidos à cultura microbiana.

As amostras do biofilme supragengival eram removidas com auxílio de curetas esterilizadas e transferidas para meio de transporte VMGA III e para criotubos contendo água ultrapura Milli Q. A coleta desses espécimes era realizada antes do exame dentário e profilaxia.

3.3.2 Biofilme subgengival

Os espécimes do biofilme subgengival eram obtidos com o uso de cones de papel absorvente esterilizados (GAETTI-JARDIM JR. et al., 1996), após a remoção do biofilme supragengival. A seguir, depois de permanecerem por 30 segundos no interior dos sulcos gengivais ou bolsas periodontais, os cones de papel eram transferidos para criotubos contendo água ultrapura (para a extração de DNA) e para tubos contendo meio de transporte VMGA III (cultivo microbiano) e enviadas ao laboratório para o adequado processamento.

3.3.3 Amostras da mucosa bucal

As coletas das amostras oriundas das mucosas bucais eram feitas por meio de zaragatoas alginatadas que eram gentilmente friccionadas contra o dorso da língua, assoalho de boca, vestíbulo bucal e mucosa jugal. A seguir,

como para os demais espécimes clínicos, as zaragatoas utilizadas eram transferidas para meio de transporte VMGA III e para tubos contendo água ultra-pura MilliQ, para o isolamento microbiano e extração de DNA para a detecção dos patógenos por PCR, respectivamente.

3.4. Isolamento e Identificação dos microrganismos

Os espécimes mantidos em tubos contendo meio de transporte VMGA III eram submetidos a diluições seriadas em solução de VMG I, para minimizar o contato dos microrganismos com o oxigênio atmosférico. Dessas diluições, alíquotas de 0,1 ml eram inoculadas em placas contendo o ágar “Fastidious Anaerobe” acrescido de hemina (5 µg/mL), menadiona (1 µg/mL) e 5% de sangue desfibrinado de cavalo, que eram incubadas em condições de anaerobiose, a 37°C, por 14 dias. Os espécimes clínicos eram processados dentro de um prazo de 4 horas de sua coleta.

A proporção que a espécie alvo ocupava na população microbiana total era calculada como a fração representada pelo crescimento da espécie no meio seletivo em relação ao crescimento microbiano no ágar sangue hemina e menadiona. Esses dados foram comparados com os obtidos através do real-time PCR, onde o número de cópias do DNA desse anaeróbio era comparado com o total de DNA detectado na amostra.

Após o isolamento dos microrganismos e obtenção de cultura pura, eram realizadas as análises morfofocelar e morfocolonial dos mesmos, além do teste respiratório, para caracterizar o relacionamento do isolado com o oxigênio atmosférico. A seguir procedia-se a identificação em nível de espécie dos isolados (GOMES et al., 2004; GAETTI-JARDIM Jr et al., 2008). A identificação dos isolados de *P. gingivalis* era realizada através do “kit comercial” da BioMérieux Rapid ID 32A.

3.5. Detecção de *P. gingivalis* por PCR

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água Milli Q era extraído através do “kit” QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha), segundo as instruções dos fabricantes. As concentrações dos DNA bacterianos eram determinadas em espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640), com leitura

da absorbância ($A_{260\text{ nm}}$), e mantidos a -196°C até a realização das reações de amplificação.

A amplificação do DNA era realizada em volumes de 25 μl , contendo 2,5 μl de 10 X tampão PCR, 1,25 μl de MgCl_2 (50 mM), 2,0 μl de dNTP (10 mM), 0,25 μl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U), 1,0 μl de cada iniciador (0,4 μM), 7 μl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 μl de DNA (ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); de 30 a 36 ciclos de 94°C (1 min.), 60°C por 30s., 72°C (1 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min.), para a extensão final da cadeia de DNA em amplificação.

Em todas as reações eram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência do microrganismo estudado. Os produtos da amplificação pelo PCR eram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e fotografados sobre transiluminador de luz UV, com câmara Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP). A sequência dos oligos e a temperatura de anelamento desses iniciadores são apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de PCR convencional.

Iniciadores específicos	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
Universal	5'-CCG AAA ACG TTG ATT CAA G-3'	58°C
	5'-CGT GTT ACC CGG ATG GTA -3'	
<i>P. gingivalis</i>	5'-TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA CC-3'	60°C
	5'-ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC-3'	

3.6. Detecção do microrganismo alvo por real-time PCR

Essa metodologia permitiu avaliar a presença ou ausência do patógeno na amostra clínica e quantificar o DNA alvo nas amostras, empregando-se, para tanto, iniciadores, sondas e condições de amplificação específicas para

cada agente infeccioso (JERVOE-STORM et al., 2007). O sistema TaqMan foi utilizado na detecção e quantificação desse patógeno.

Nesse sistema, a sonda fluorescente utilizada é marcada no sentido 5' com 6-carboxifluoresceína (*reporter dye*) e no sentido 3' com 6-carboxitetrametilrodamina (*quencher dye*). A emissão fluorescente desse sistema TaqMan dependia de uma sonda (equivalente a um terceiro iniciador) que anelava especificamente entre os dois iniciadores utilizados, o que torna o processo mais preciso e específico. Além desse aspecto, só havia a detecção da amplificação quando existiam sítios de anelamento tanto para o par de iniciadores como para a sonda.

As reações de amplificação eram realizadas em volumes finais de 25 µl, contendo 1X Master Mixture TaqMan Universal (tampão PCR, dNTP, AmpliTaq Gold, sinal de referência interno, [6-carboxi-'x'-rodamina], uracil *N*-glicosidase-UNG, MgCl₂; Applied Biosystem, Foster City, Calif), 900 nM de cada iniciador, 200 nM da sonda e 5 µl do DNA. As curvas-padrão foram construídas a partir de diluições conhecidas de DNA. As condições dos ensaios consistiam de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15s e 57°C por 60 s.

A curva “threshold” (C_T) foi definida como o ciclo no qual a fluorescência torna-se detectável acima da fluorescência de fundo e inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias empregado. Em todas as reações de amplificação foram empregadas cepas de referência como controles positivos e água ultrapura como controle negativo. Os iniciadores e sondas utilizados nessas reações são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de Real-Time PCR.

Iniciadores específicos	Iniciadores e sondas	Temperatura de anelamento
<i>P. gingivalis</i>	5'-TGC AAC TTG CCT TAC AGA GGG -3'	57°C
	5'- ACT CGT ATC GCC CGT TAT TC-3'	
Bactérias totais	5'- AGC TGT AAG ATA GGC ATG CGT CCC ATT AGC TA-3'(sonda)	58°C
	5'-TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A -3'	
	5'-TGC GGG ACT TAA CCC AAC A -3'	
	5'-CAC GAG CTG ACG ACA (AG)C CAT GCA -3'(sonda)	

3.7. Determinação da susceptibilidade de *P. gingivalis* aos antibióticos e quimioterápicos com atividade antimicrobiana (Não Prevista Inicialmente).

Foi realizada de acordo com o método de diluição em ágar. Os antimicrobianos (amoxicilina, ácido clavulânico/amoxicilina, azitromicina, cefoxitina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, imipenem, meropenem, metronidazol, minociclina, penicilina G, rifampicina, tetraciclina) eram adicionados ao ágar Wilkins-Chalgren, acrescido de extrato de levedura (0,5%), hemina (5 µg/mL), menadiona (1 µg/mL) e sangue desfibrinado de cavalo (5%). Os antimicrobianos foram acrescidos aos meios de cultura em concentrações crescentes que variaram de 0,006 µg/mL a 512 µg/mL. Como controles, foram utilizados os meios de cultura sem a adição de agentes inibidores.

Em seguida, as placas foram inoculadas com 10⁵ UFC/ “botão” de cada isolado testado, através de replicador de Steer's, e incubadas por 24-72 horas. A concentração inibitória mínima dos antimicrobianos foi conceituada como sendo a menor concentração da droga que inibiu totalmente o crescimento microbiano. O microrganismo capaz de crescer em concentrações iguais ou superiores ao ponto crítico de cada droga (máxima concentração terapêutica da droga) era considerado resistente.

Na interpretação dos resultados, os pontos críticos utilizados foram os recomendados pelo “*National Committee for Clinical Laboratory Standards*”. O ponto crítico para os microrganismos susceptíveis foram: amoxicilina

$\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$, amoxicilina/clavulanato $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, cefoxitina $\leq 16 \mu\text{g/mL}$, clindamicina $1 \mu\text{g/mL}$, imipenem $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, lincomicina $4 \mu\text{g/mL}$, meropenem, $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, metronidazol $\leq 8 \mu\text{g/mL}$, penicilina G $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ e tetraciclina $\leq 4 \mu\text{g/mL}$.

Pontos críticos para os microrganismos de susceptibilidade intermediária e resistentes foram: amoxicilina $1 \mu\text{g/mL}$ e $2 \mu\text{g/mL}$, amoxicilina/clavulanato $8/4 \mu\text{g/mL}$ e $16/8 \mu\text{g/mL}$, cefoxitina $32 \mu\text{g/mL}$ e $64 \mu\text{g/mL}$, clindamicina $2 \mu\text{g/mL}$ e $4 \mu\text{g/mL}$, imipenem $8 \mu\text{g/mL}$ e $16 \mu\text{g/mL}$, lincomicina $8 \mu\text{g/mL}$ e $16 \mu\text{g/mL}$, meropenem $8 \mu\text{g/mL}$ e $16 \mu\text{g/mL}$, metronidazol $16 \mu\text{g/mL}$ e $32 \mu\text{g/mL}$, penicilina G $1 \mu\text{g/mL}$ e $2 \mu\text{g/mL}$ e tetraciclina $8 \mu\text{g/mL}$ e $16 \mu\text{g/mL}$.

Os isolados que se mostraram moderadamente sensíveis a qualquer dos β -lactâmicos testados foram submetidos a testes para avaliar a produção de β -lactamases, empregando-se para tanto a nitrocefina. Nesses testes, fragmentos de 4 a 5 colônias do microrganismo resistente eram posicionados sobre discos de papel de filtro de 6mm (Cefinase), impregnados de cefalosporina cromogênica umedecidos com solução salina. Após 10-60 minutos de contato, verificava-se a presença de cor castanho-rosácea indicativa da degradação do substrato cromogênico.

3.9. Genotigem do gene *fimA* de *P. gingivalis*.

O DNA dos microrganismos isolados, bem como o DNA dos espécimes clínicos foram submetidos à amplificação utilizando-se de iniciadores específicos para os diferentes alelos do gene *fimA*, responsável pela produção da proteína fimbrial desse anaeróbio e intimamente associado às infecções periodontais e virulência do microrganismo.

Os testes foram realizados de acordo com as metodologias descritas por Amano et al. (1999) e Nakagawa et al. (2000; 2002b). Os iniciadores utilizados são apresentados na Tabela 3. Como controle positivo das reações de amplificação, empregou-se o DNA de *P. gingivalis* ATCC 33277, e a amplificação do DNA também foi realizada com os iniciadores universais voltados para o 16SrDNA, capaz de interagir com o DNA que codifica para o rRNA de praticamente todas as eubactérias.

Tabela 3. Iniciadores específicos utilizados nos ensaios para genotipagem do gene *fimA*.

Iniciadores	Sequência (5' a 3')	Amplicon (bp)	Referencia
16S rDNA	TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC	197	Amano et al., 1999
<i>fimA</i> tipo I	CTG TGT GTT TAT GGC AAA CTT C AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	392	Amano et al., 1999
<i>fimA</i> tipo Ib	CAG CAG AGC CAA AAA CAA TCG TGT CAG ATA ATT AGC GTC TGC	271	Nakagawa et al., 2002
<i>fimA</i> tipo II	ACA ACT ATA CTT ATG ACA ATG G AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	257	Amano et al., 1999
<i>fimA</i> tipo III	ATT ACA CCT ACA CAG GTG AGG C AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	247	Amano et al., 1999
<i>fimA</i> tipo IV	CTA TTC AGG TGC TAT TAC CCA A AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A	251	Amano et al., 1999
<i>fimA</i> tipo V	AAC AAC AGT CTC CTT GAC AGT G TAT TGG GGG TCG AAC GTT ACT GTC	462	Nakagawa et al., 2002

A amplificação do DNA era realizada em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10 X tampão PCR, 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 2,0 µl de dNTP (10 mM), 0,25 µl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM), 7 µl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 µl de DNA (ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); de 35 ciclos de 94°C (30 s.), 58°C por 30s., 72°C (1 min.) e 1 ciclo de 72°C (7 min.), para a extensão final da cadeia de DNA em amplificação. Os amplicons eram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (1 M Tris, 0,9 M ácido bórico, 0,01 M EDTA, pH 8.4) e corados com brometo de estúdio (0,5 mg/mL).

4. Análise Estatística

As diferenças entre a população dos cocos cariogênicos e demais microrganismos serão avaliadas através de análise de variância, com nível de significância de 5%. *Odds ratios* serão calculados para determinar a possibilidade de inter-relações entre os diferentes grupos e espécies microbianas e teste de Qui-Quadrado, Mann-Whitney e teste exato de Fisher para avaliar a significância dessas possíveis associações.

Para os microrganismos detectados por PCR convencional ou seminested PCR, a prevalência será avaliada por meio de análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos. A existência de correlações entre diferentes espécies microbianas na cavidade bucal será determinada através do teste de Correlação de Spearman.

5. Resultados.

Dos 50 pacientes selecionados que concluíram a terapia, 45 eram portadores de carcinoma espinocelular com diferentes graus de diferenciação celular. Três casos de neoplasias malignas indiferenciadas foram detectados, bem como dois casos de pacientes portadores de carcinoma basoescamoso. Oito pacientes eram do gênero feminino e 42 do gênero masculino, com idade variando de 12 a 81 anos (média de $53,4 \pm 11,5$ anos).

Desses pacientes, 32 se mostraram leucodermas, 14 pardos, dois melanodermas e dois pacientes imigrantes asiáticos. Quanto aos níveis de escolaridade, 70% dos pacientes apresentavam o primeiro grau incompleto, 18% se declararam analfabetos, 10 % tinham o segundo grau completo e 2% não completaram o segundo grau. Histórico de câncer esteve presente nos familiares ascendente de 54% dos pacientes atingidos, sendo que histórico de tabagismo crônico foi observado em 92% dos pacientes, enquanto que o etilismo foi observado em 62% dos pacientes examinados (muitos dos quais haviam deixado de consumir bebidas alcoólicas apenas por ocasião do início da radioterapia), os quais declaravam possuir diferentes graus de dependência química.

Dos pacientes examinados, apenas 32% seguiram a orientação do centro de radioterapia e receberam algum tratamento odontológico previamente à realização da radioterapia. Nesses pacientes, eram realizados tratamentos restauradores, extrações de elementos dentais periodontalmente condenados e tratamento endodôntico. Apenas 12% dos pacientes mostravam-se livres de cáries com cavitação no início do tratamento radioterápico. Observou-se que 40% dos pacientes eram edêntulos e usuários de próteses totais, enquanto que 28% evidenciavam a presença de gengivite associada ao biofilme microbiano; 30% eram portadores de periodontite crônica e apenas um único paciente apresentou condições periodontais saudáveis.

Os pacientes apresentavam condições bastante variáveis de higiene bucal, sendo que 22 % apresentaram uma higiene satisfatória, enquanto 24% higiene regular, 54% condições precárias de higiene. Sendo que entre esses últimos, 75% eram usuários de próteses totais, o que pode ter

facilitado a implantação de candidose observada logo no início da radioterapia.

Pela Tabela 4 verifica-se que a ocorrência de mucosite, dermatite, xerostomia, disgeusia e, em menor grau, candidose foram bastante comuns nos pacientes irradiados e que a frequência dessas alterações se manteve bastante elevada nesses pacientes mesmo 12 meses após a conclusão da radioterapia. Infelizmente, ao longo da radioterapia, muitos pacientes vieram a falecer ou estavam em condições físicas que não permitiam a realização de novas coletas de espécimes clínicos e avaliações das condições de saúde bucal, com perda bastante significativa da qualidade de vida.

Assim, a precariedade das condições de saúde dos pacientes irradiados se mostra em toda a sua extensão quando se verifica que 14% dos pacientes inicialmente tratados através de radioterapia não puderam concluir o tratamento em função das complicações bucais associadas, em particular, a mucosite. Esse aspecto, associado ao fato de que apenas 32% dos pacientes receberam algum procedimento odontológico preventivo, evidencia a necessidade de melhorar o preparo do paciente oncológico que será submetido a essa modalidade de tratamento, uma vez que a maioria dos próprios pacientes apenas passa a valorizar o trabalho do cirurgião-dentista quando ocorre a exacerbação das infecções oportunistas periodontais ou a xerostomia severa facilita o desenvolvimento de cáries de radiação. Nessa condição, a extração de dentes previamente comprometidos é temerária e pode acarretar o aparecimento de infecções sérias, como a osteomielite associada à radiação, a qual é de tratamento longo e, por vezes, falha em responder ao uso de antimicrobianos.

Nesses pacientes, destacou-se a mucosite, sendo que logo após o final da radioterapia 66% apresentavam grau III ou IV de mucosite, sendo que 6 meses após, nenhum paciente apresentou mucosite severa e, embora 56% ainda apresentassem sinais e sintomas dessa enfermidade, todos eram portadores dessa condição em um grau leve ou moderado (Tabela 4).

O gênero dos pacientes não interferiu com a ocorrência de mucosite (teste exato de Fisher, $P= 0,578$), dermatite (teste exato de Fisher, $P= 0,578$), disgeusia (teste exato de Fisher, $P= 1,0$) e xerostomia (teste exato de Fisher,

P= 0,568). Nesse sentido, a condição dental inicial não interferiu com a ocorrência de mucosite (teste Qui-quadrado, P = 0,139), dermatite (teste Qui-quadrado, P= 0,822), disgeusia (teste Qui-quadrado, P= 0,792) e xerostomia (teste Qui-quadrado com p = 0,552), mas interferiu significativamente com queixas relativas à sensibilidade dolorosa (teste Qui-quadrado com p = 0,018). Observou-se também que a ocorrência de mucosite (teste Qui-quadrado, P = 0,779), dermatite (teste qui-quadrado com p = 0,940), disgeusia (teste Qui-quadrado, P= 0,205), xerostomia (teste Qui-quadrado com p = 0,382) não são influenciadas pela condição periodontal do paciente.

Como os pacientes foram submetidos a dois esquemas de dosagens de radiação através de acelerador linear, sendo que a grande maioria dos pacientes foi submetida à 5040 cGy, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os efeitos deletérios da radioterapia nas duas dosagens totais utilizadas (mucosite, Teste exato de Fisher, P= 0,398; dermatite, Teste exato de Fisher, P=0,398; disgeusia, Teste exato de Fisher, P= 0,690; xerostomia, Teste exato de Fisher, P= 0,171).

O consumo de bebidas alcoólicas não afetou significativamente a ocorrência e a severidade da mucosite (Teste exato de Fisher, P= 0,218), dermatite (Teste exato de Fisher, P= 0,658), disgeusia (Teste exato de Fisher, P= 0,945), xerostomia (Teste exato de Fisher, P= 1,0), sendo que esses efeitos colaterais também não foram afetados pelo tempo de consumo de bebidas alcoólicas (mucosite, Teste de Mann-Whitney, P= 0,714; dermatite, Teste de Mann-Whitney, P= 0,316; disgeusia, Teste de Mann-Whitney, P= 0,884; xerostomia, Teste de Mann-Whitney, P= 0,510) ou a quantidade consumida (mucosite, Teste de Mann-Whitney, P= 0,213; dermatite, Teste de Mann-Whitney, P= 0,727; disgeusia, Teste de Mann-Whitney, P= 0,753; xerostomia, Teste de Mann-Whitney, P= 0,646). Dentre os efeitos colaterais da radioterapia, a mucosite e a xerostomia foram os que se mostraram de maior duração, atingindo 52,2 % e 47,8% dos pacientes após um ano da realização da radioterapia, embora a sensação de “boca seca” tenha sofrido alguma atenuação no período, o mesmo ocorrendo com a severidade da mucosite.

Quanto às condições periodontais, inicialmente esperava-se encontrar uma população que se dividisse de forma mais homogênea entre as

categorias de “periodontalmente sadios”, “pacientes com gengivite”, “pacientes com periodontite” e “desdentados portadores de prótese” mas não foi essa a realidade observada. Com exceção de um único paciente periodontalmente sadio, todos os pacientes portadores de dentes apresentavam gengivite ou periodontite, sendo que aproximadamente metade dos pacientes irradiados era usuária de prótese total. O consumo de bebidas alcoólicas mostrou relação com o grau de mobilidade dental (teste de Qui-quadrado, $P < 0,001$). A presença de retenção de alimentos na cavidade bucal evidenciou relação com idade, mas os pacientes mais idosos apresentavam mais problemas periodontais e dentais, além de presença de sangramento gengival (teste de Qui-quadrado, $P = 0,011$).

Os dados que mostram que o índice de sangramento, índice gengival, mobilidade dental ou perda óssea não foram influenciados pela autodeclarada frequência de escovação e uso de fio dental (teste de Qui-quadrado, $P = 0,001$). Assim, é possível que a veracidade dessas respostas seja questionável ou que esses procedimentos, na população estudada, apresentem baixa eficiência em função das dificuldades técnicas de sua implementação individual sem palestras de higiene bucal prévias. Indivíduos que consumiam álcool ou tabaco apresentaram menor probabilidade de utilizar o fio dental, sendo que aqueles que relatam maior frequência de escovação apresentam maior probabilidade de utilizar o fio dental (teste de Qui-quadrado, $P = 0,003$).

Tabela 4. Alterações bucais observadas ao longo e após a radioterapia.

Condição clínica	Momento do exame clínico N(%)				
	Antes da RT	Imediatamente após a RT	30 dias após RT	6 meses após RT	1 ano após RT*
Mucosite	0 (0,0)	45 (90,0)	40 (80)	28 (56,0)	11 (47,8)
Dermatite	1 (2,0)	43 (86,0)	38 (76,0)	13 (26,0)	4 (17,4)
Candidose	1 (2,0)	27 (54,0)	20 (40,0)	7 (14,0)	6 (26,1)
Disgeusia	0 (0,0)	44 (88,0)	31 (62,0)	23 (46,0)	8 (34,8)
Xerostomia	0 (0,0)	47 (94,0)	38 (76,0)	21 (42,0)	12 (52,2)

*Dados relativos a 23 pacientes com os quais foi possível manter o acompanhamento clínico

Tabela 5. Ocorrência e severidade da mucosite associada à radioterapia para tratamento de câncer de cabeça e pescoço.

Severidade da mucosite	Momento do exame clínico N(%)			
	Imediatamente após a RT	30 dias após RT	6 meses após RT	12 meses após RT
Ausência de mucosite	5 (10,0)	10 (20,0)	22 (44,0)	12 (52,2)
Mucosite				
Grau I	7 (14,0)	13 (22,0)	25 (50,0)	11 (47,8)
Grau II	10 (20,0)	11 (22,0)	3 (6,0)	0 (0,0)
Grau III	21 (42,0)	13 (26,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Grau IV	7 (14,0)	3 (6,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	45 (90,0)	40 (80,0)	28 (56,0)	0 (0,0)

A presença ou ausência de *P. gingivalis* no biofilme subgengival e supragengival, bem como nas mucosas (Teste exato de Fisher, $P= 1,0$), não modificou a ocorrência e severidade da mucosite, bem como ocorrência de dermatite, xerostomia e disgeusia. *P. gingivalis* foi detectada com uma frequência significativamente mais elevada nos pacientes com periodontite (Teste de Qui-quadrado $P= 0,003$), em relação aos portadores de gengivite aos usuários de próteses totais no arco superior e inferior.

A presença de *P. gingivalis* nas amostras clínicas evidencia que o mesmo é freqüente nos pacientes irradiados. Para *P. gingivalis*, o habitat principal na cavidade bucal se deu no biofilme e subgengival (teste de Qui-quadrado, $P < 0,001$), sendo que a sua frequência de detecção foi mais elevada em pacientes que apresentavam sangramento gengival. A perda de inserção conjuntiva se mostrou estatisticamente ligada à colonização do biofilme por *P. gingivalis*, sendo que esse microrganismo também foi isolado e detectado com maior frequência de sítios periodontais com retenção de alimentos.

A prevalência de *P. gingivalis*, ao longo do experimento, foi submetida a análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos, e mostrou que esse anaeróbio tornou-se mais prevalente no biofilme subgengival ($P= 0,009$), supragengival ($P= 0,006$), saliva ($P= 0,001$) e nas mucosas ($P=0,015$) com a radioterapia. Nos indivíduos colonizados por esse

microrganismo observou-se também um aumento da população de *P.gingivalis* ao longo da radioterapia e após a mesma, mantendo-se aproximadamente constante entre 30 dias e 6 meses após a conclusão do tratamento (ANOVA, $P= 0,013$).

Tabela 6. Ocorrência de *P. gingivalis* na microbiota bucal de pacientes que seriam submetidos à radioterapia.

Método	Amostra N(%)			
	Biofilme subgengival ¹	Biofilme supragengival ¹	Saliva ²	Mucosa ²
Cultura	7 (23,3)	7 (23,3)	11 (22,0)	5 (10,0)
PCR convencional	11 (36,7)	9 (30,0)	15 (30,0)	12 (24,0)
Real-time PCR	12 (40,0)	11 (36,7)	19 (38,0)	18 (36,0)

¹Dados relativos aos pacientes com elementos dentais (N=30).

²Dados relativos a todos os pacientes, edêntulos ou portadores de dentes (N=50).

Tabela 7. Ocorrência de *P. gingivalis* na microbiota de pacientes após a radioterapia.

Método	Amostra N(%)			
	Biofilme subgengival ¹	Biofilme supragengival ¹	Saliva ²	Mucosa ²
Cultura	11 (36,7)	7 (23,3)	14 (28,0)	8 (16,0)
PCR convencional	19 (63,3)	11 (36,7)	21 (42,0)	17 (34,0)
Real-time PCR	19 (63,3)	17 (56,7)	22 (44,0)	20 (40,0)

¹Dados relativos aos pacientes com elementos dentais (N=30).

²Dados relativos a todos os pacientes, edêntulos ou portadores de dentes (N=50).

Tabela 8. Ocorrência de *P. gingivalis* na microbiota dos pacientes, 30 dias após a radioterapia.

Método	Amostra N(%)			
	Biofilme subgengival ¹	Biofilme supragengival ¹	Saliva ²	Mucosa ²
Cultura	11 (36,7)	6 (20,0)	11 (22,0)	7 (14,0)
PCR convencional	17 (56,7)	12 (40,0)	19 (38,0)	14 (28,0)
Real-time PCR	19 (60,0)	14 (46,7)	19 (38,0)	18 (36,0)

¹Dados relativos aos pacientes com elementos dentais (N=30).

²Dados relativos a todos os pacientes, edêntulos ou portadores de dentes (N=50).

Tabela 9. Ocorrência de *P. gingivalis* na microbiota dos pacientes, 6 meses após a radioterapia.

Método	Amostra N(%)			
	Biofilme subgengival ¹	Biofilme supragengival ¹	Saliva ²	Mucosa ²
Cultura	11 (36,7)	6 (20,0)	14 (28,0)	10 (20,0)
PCR convencional	14 (46,7)	11 (36,7)	15 (30,0)	11 (22,0)
Real-time PCR	17 (56,7)	14 (46,7)	13 (26,0)	15 (30,0)

¹Dados relativos aos pacientes com elementos dentais (N=30).

²Dados relativos a todos os pacientes, edêntulos ou portadores de dentes (N=50).

Tabela 10. Ocorrência de *P. gingivalis* no sulco gengival de pacientes com diferentes condições de saúde periodontal ao longo do tratamento radioterápico.

Método	Pacientes N(%)	
	Gengivite (N=14)	Periodontite (N=15)
Antes da RT		
Cultura	2 (14,3)	6 (40)
PCR convencional	4 (28,6)	8 (53,3)
Real-time PCR	4 (28,6)	8 (53,3)
Após RT		
Cultura	4 (28,6)	7 (46,7)
PCR convencional	6 (42,9)	13 (86,7)
Real-time PCR	6 (42,9)	13 (86,7)
30 dias após RT		
Cultura	4 (28,6)	7 (46,7)
PCR convencional	6 (42,9)	11 (60,0)
Real-time PCR	7 (50,0)	12 (80,0)
6 meses após RT		
Cultura	3 (21,4)	8 (53,3)
PCR convencional	4 (28,6)	10 (66,7)
Real-time PCR	6 (42,9)	11 (60,0)

Tabela 11. População de *P.gingivalis* em diferentes sítios anatômicos e saliva, em diferentes momentos do estudo, segundo dados obtidos através de Real-Time PCR.

Amostra	UFC/mL (média±desvio padrão)			
	Antes da RT	Após RT	30 dias após RT	6 meses após RT
Biofilme subgengival	$4,1.10^4 \pm 1,5 .10^4$	$5,3.10^5 \pm 3,4 .10^4$	$6,9.10^5 \pm 2,7 .10^5$	$1,1.10^6 \pm 1,3 .10^6$
Biofilme supragengival	$1,1.10^4 \pm 1,2 .10^4$	$2,8.10^4 \pm 2,2 .10^4$	$2,2.10^5 \pm 1,01 .10^5$	$7,3.10^4 \pm 4,9 .10^4$
Saliva	$8,5.10^2 \pm 3,6 .10^2$	$9,8.10^2 \pm 1,32 .10^3$	$9,3.10^3 \pm 4,2 .10^3$	$6,4.10^3 \pm 4,8 .10^3$
Mucosa	$6,2.10^2 \pm 2,9 .10^2$	$7,5.10^3 \pm 4,1 .10^3$	$4,6.10^4 \pm 3,9 .10^4$	$8,1.10^3 \pm 6,5 .10^3$

No presente estudo, *P. gingivalis* foi cultivado 14,3% das amostras de biofilme subgengival de pacientes com gengivite e de 40% dos pacientes com periodontite, antes do início da radioterapia, sendo que sua detecção por PCR revelou esse microrganismo em 28,6% e 53,3% dessas amostras, respectivamente. Após 6 meses da realização da radioterapia, esse anaeróbio podia ser cultivado/detectado de 21,4% das amostras de pacientes com gengivite e de 53,3% (cultivo) e 66,7% (PCR) dos pacientes com periodontite.

Os testes de susceptibilidade a antibióticos e quimioterápicos com atividade antimicrobiana revelaram sensibilidade universal à associação amoxicilina/clavulanato, cefoxitina, clindamicina, metronidazol, imipenem, lincomicina e meropenem, enquanto alguns isolados foram moderadamente sensíveis à amoxicilina, penicilina G e tetraciclina. Dos 16 isolados moderadamente sensíveis à amoxicilina e penicilina G, 3 (3,2%) produziram β -lactamases.

Tabela 12. Resistência de 93 isolados de *P. gingivalis* obtidos de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento do câncer de cabeça e pescoço.

Antimicrobianos	N (%)			CIM($\mu\text{g/mL}$) ¹		
	S ²	I ³	R ⁴	Variação	CIM ₅₀	CIM ₉₀
amoxicilina	82 (88,2)	11 (11,8)	0 (0,0)	$\leq 0.006-2$	0,25	2
amoxicilina/acido clav.	93 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	$\leq 0.006-2$	0,125	2
cefoxitina	93 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	$\leq 0.006-4$	0,5	1
clindamicina	93 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	$\leq 0.006-1$	0,125	1
imipenem	93 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	$\leq 0.006-1$	$\leq 0,006$	1
lincomicina	93 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	$\leq 0.006-2$	0,25	1
meropenem	93 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	$\leq 0.006-1$	$\leq 0,006$	1
metronidazol	93 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	$\leq 0.006-1.0$	$\leq 0,006$	0,5
penicilina G	78 (83,9)	15 (16,1)	0 (0,0)	$\leq 0.006-2$	0,125	2
tetraciclina	85 (91,3)	8 (8,6)	0 (0,0)	0,125-4	0,25	1

¹Concentração inibitória mínima

²Isolados susceptíveis

³Isolados de susceptibilidade intermediária

⁴Isolados resistentes

Dos 93 isolados clínicos de *P. gingivalis* e das 228 amostras de biofilme positivas para esse microrganismo, o genótipo *fimA* II foi o mais freqüentemente detectado, conforme apresentado na Tabela 13, seguido por *fimA* tipo IV e *fimA* tipo V. Não foram observadas correlações estatísticas entre os diferentes genótipos de *P. gingivalis*, no que concerne ao gene *fimA*, e a ocorrência ou severidade dos efeitos colaterais da radioterapia ou qualquer outros parâmetro clínicos, com a exceção do fato de que *P. gingivalis fimA* tipo II foi o predominante nos pacientes irradiados, independentemente da condição periodontal dos mesmo (teste de Qui-quadrado, $P < 0,001$).

Tabela 13. Iniciadores específicos utilizados nos ensaios para genotipagem do gene *fimA* de isolados obtidos ao longo de estudo e das amostras de biofilme subgengival positivas para esse anaeróbio.

Genótipos fimbriais	Momento da coleta N(%)									
	Antes da RT		Após RT		30 dias após RT		6 meses após a RT		Total N (%)	
	Isol. ¹	Amost. ²	Isol. ³	Amost. ⁴	Isol. ⁵	Amost. ⁶	Isol. ⁷	Amost. ⁸	Isol. ⁹	Amost. ¹⁰
<i>fimA</i> tipo I	1(5,0)	3 (6,4)	0 (0,0)	2 (2,9)	0 (0,0)	0(0,0)	1(5,3)	1(2,0)	2(2,2)	6(2,6)
<i>fimA</i> tipo Ib	0 (0,0)	0(0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0(0,0)	0 (0,0)	0(0,0)	0 (0,0)	0(0,0)
<i>fimA</i> tipo II	11(55,0)	16(34,1)	18(60,0)	27(39,7)	15(62,5)	25(40,3)	10(52,6)	21(41,2)	54(58,1)	89(39,0)
<i>fimA</i> tipo III	0 (0,0)	2(4,2)	0 (0,0)	3 (4,4)	0 (0,0)	1(1,5)	0 (0,0)	0(0,0)	0 (0,0)	6(2,6)
<i>fimA</i> tipo IV	5(25,0)	8(17,1)	7 (23,3)	11(16,2)	6(25,0)	12(19,4)	5(26,3)	11(21,6)	23(24,7)	42(18,4)
<i>fimA</i> tipo V	3(15,0)	5(10,6)	5 (16,7)	10(14,7)	3(12,5)	9(14,5)	3(15,7)	7(13,7)	14(15,1)	31(13,6)
<i>fimA</i> tipos II + IV	-	5(10,6)	-	6 (8,8)	-	6(9,7)	-	6(11,8)	-	23(10,1)
<i>fimA</i> tipos II + V	-	7(14,9)	-	5 (7,4)	-	4(6,5)	-	4(7,8)	-	20(8,8)
<i>fimA</i> tipos II + IV + V	-	1(2,1)	-	4 (5,9)	-	5(8,1)	-	1(2,0)	-	11(4,9)

¹Isolados obtidos antes da RT (radioterapia). N= 20.

²Amostras de biofilme sub e supragengival, saliva e mucosa positivas para *P. gingivalis* antes da RT. N= 47.

³Isolados obtidos após a conclusão da RT. N= 30.

⁴Amostras de biofilme sub e supragengival, saliva e mucosa positivas para *P. gingivalis* após a radioterapia. N= 68.

⁵Isolados obtidos 30 dias após a RT. N= 24.

⁶Amostras de biofilme sub e supragengival, saliva e mucosa positivas para *P. gingivalis* 30 dias após a RT. N= 62.

⁷Isolados obtidos 6 meses após a radioterapia. N= 19.

⁸Amostras de biofilme sub e supragengival, saliva e mucosa positivas para *P. gingivalis* 6 meses após a RT. N= 51

⁹Total de isolados obtidos e identificados no estudo. N= 93.

¹⁰Total de amostras de biofilme sub e supragengival, saliva e mucosa positivas para *P. gingivalis* ao longo do estudo. N= 228.

6. Discussão.

Embora a radioterapia tenha a capacidade de aumentar a sobrevida do paciente oncológico, dependendo da neoplasia maligna que o mesmo desenvolveu, seus efeitos colaterais afetam profundamente a qualidade de vida do paciente, alguns dos quais passam a esquecer o próprio câncer em função das dores, ardores e seqüelas do tratamento utilizado. Assim, embora as aplicações diminuam o tamanho do tumor, reduzindo hemorragias e outros sintomas da neoplasia, as mesmas aplicações produzem seus “novos e próprios sintomas” no paciente, o qual deve ser instruído sobre os métodos que visam minimizar os efeitos colaterais do tratamento, como o uso fluoretos e digluconato de clorexidina para aqueles que apresentam auto risco à cárie, aprimoramento da higiene bucal, tratamento medicamentoso para supressão das infecções oportunistas por fungos entre outros.

Assim, é de extrema relevância o fato de que a maioria dos pacientes não dá importância ao tratamento odontológico prévio, o mesmo ocorrendo com muitos oncologistas e profissionais da área médica. Assim, a significativa redução no número de pacientes, em função dos efeitos colaterais observados e de óbitos relativos ao câncer, era esperada. Embora tenhamos procurado minimizar os efeitos do tratamento, com orientações de dieta e cuidados com a higiene, não dispúnhamos de liberdade e infraestrutura para o atendimento ambulatorial de odontologia nesses pacientes, os quais eram, quando necessário, encaminhados para o sistema de atendimento odontológico municipal, na figura do Dr. Luis Fernando Landucci, mestre e doutor em Biopatologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, que procurava, mesmo evitando procedimentos cruentos, como os cirúrgicos, diminuir o desconforto.

Desde que cada pessoa reage de forma diferente à radioterapia, onde a intensidade dos efeitos deletérios depende da dose do tratamento, da parte do corpo tratada, da extensão da área irradiada, tipo de irradiação e aparelho utilizado (KOGA ET al., 2008), a ocorrência desses efeitos é quase universal, principalmente em pacientes terminais, como a grande maioria

dos pacientes estudados, onde a debilidade orgânica produzida pela neoplasia se soma aos efeitos citotóxicos diretos e indiretos da radiação. Como agravante, pelo estadiamento das lesões neoplásicas, poucos pacientes podiam esperar a realização de tratamento odontológico preventivo como forma de melhorar a qualidade de vida durante e imediatamente após a radioterapia.

As radiações, ao interagirem com os tecidos, dão origem a elétrons acelerados que ionizam o meio, criando efeitos químicos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA. A morte celular pode ocorrer então por diversos mecanismos, desde a inativação de do metabolismo primário celular até sua capacidade de proliferação. Para que o efeito biológico atinja maior número de células neoplásicas e a tolerância dos tecidos normais seja respeitada, a dose total de radiação a ser administrada é habitualmente fracionada em doses toleráveis, o que, obviamente, varia de acordo com o paciente e outros fatores acima mencionados (BONAN et al., 2005).

Os efeitos imediatos são observados nos tecidos que apresentam maior capacidade proliferativa, como as gônadas, a epiderme, a mucosas oral, sendo que essa última ainda possui fatores agravantes, como a complexa microbiota. O comprometimento do sistema imunológico, traumas locais além dos danos aos tratos digestivo, urinário e genital, bem como efeitos sobre a medula óssea, facilitam o estabelecimento de infecções oportunistas que, em outros pacientes, nunca se desenvolveriam (SONIS et al., 2001).

Esses danos são mais significativos nos tecidos que se encontram no campo de irradiação e podem ser potencializados pela administração simultânea de quimioterápicos. No entanto, no estudo aqui apresentado, não foi observada relação estatisticamente significativa entre os efeitos colaterais e a dosagem de radiação, visto que a quase totalidade dos pacientes, logo no início do tratamento, desenvolviam esses efeitos negativos, pouco se modificando durante o tratamento. Além desse aspecto, a comparação estatística entre fatores que podem estar associados depende da existência de um número mínimo de indivíduos em cada uma das variáveis examinadas. Entretanto, a quase totalidade dos pacientes recebeu a dose de

5040 cGy de radiação e esses desenvolveram os mesmos efeitos colaterais daqueles que foram submetidos a 7020 cGy, não permitindo comparações mais aprofundadas. Além desse aspecto, a maioria desses efeitos se manifesta ao redor de apenas 3000 cGy (HANDSCHEL et al., 2001), o que explica o aparecimento dos mesmo logo na segunda semana da terapia ou mesmo antes, como observado no presente estudo.

Assim, de um grupo inicial de 79 integrantes, com seis meses de acompanhamento, após a radioterapia, o grupo foi reduzido para 50, sendo que com um ano de acompanhamento tivemos uma redução adicional para 31 pacientes, dos quais estão disponíveis os dados clínicos de apenas 23. Os demais pacientes faleceram em função da neoplasia maligna ou se encontram em condições físicas que não permitiam a realização de exames clínicos ou a coleta dos espécimes para avaliação microbiológica. Nesse sentido, seria de grande valia para a qualidade de vida dos pacientes, que o cirurgião-dentista viesse a participar de maneira mais intensa do acompanhamento do paciente submetido à radioterapia para tratamento do câncer de cabeça e pescoço, como acontece em alguns centros de referência para o tratamento dessa condição.

No centro de Radioterapia de Megavoltagem de São José do Rio Preto, uma das melhores e maiores cidades do noroeste do Estado de São Paulo, essas observações se mostram críticas, porque vários cursos de graduação e pós-graduação em odontologia e medicina se encontram a curta distância e o acompanhamento dos pacientes padece da inconstância e de iniciativas pessoais de grupos médicos e odontológicos. Assim, é opinião de todos a necessidade de se colocar em prática protocolos capazes de minimizar os efeitos da radioterapia, sejam eles medicamentosos ou não. Em torno de 14% dos pacientes abandonaram o tratamento radioterápico como consequência da mucosite e da xerostomia, quando analisamos estes dados damos maior importância ao fato de que a literatura apresenta a mucosite como o maior problema que o paciente irradiado apresenta (RAMIREZ-AMADOR et al., 1997; JHAM et al., 2007).

Essas lesões se desenvolvem rapidamente e a destruição tecidual pode ser observada dias a semanas após a radioterapia. Nesse sentido, os

resultados aqui apresentados parecem suportar o conceito de que essas alterações na mucosa parecem estar ligadas a modificações qualitativas e quantitativas na saliva, microbiota bucal e na condição imunológica desses pacientes (EPSTEIN et al., 1996; LEUNG et al., 2001), de forma que medidas preventivas antes, durante e depois da radioterapia deveriam ser instituídas e incluir instruções de dieta, higiene oral, controle químico do biofilme, e cuidados semelhantes com dispositivos protéticos. Assim, o retorno periódico e a motivação do paciente deveriam ser consideradas tão importantes quanto o tratamento com agentes químicos para controle da infecção oportunista, de forma a minimizar os efeitos deletérios da mucosite sobre a qualidade de vida do paciente.

A mucosite mostrou ser a principal queixa do paciente irradiado, sendo que sua ocorrência quase que universal nesses pacientes dificultou a caracterização de fatores do hospedeiro capazes de exacerbá-la ou associados com sua origem. Nesse sentido, o mesmo pode ser dito do consumo de bebidas alcoólicas e tabaco, os quais são reconhecidamente fatores que aumentam a irritação da mucosa bucal, mas como a quase totalidade dos pacientes era constituída de usuários desses compostos, a importância de cada um não pode ser verificada, posto que falta um grupo portador de câncer de cabeça e pescoço, submetido à radioterapia, associada ou não a outras modalidades terapêuticas, mas sem o hábito de consumir essas drogas. Procurou-se formar um grupo com essa natureza, mas pelas características da população alvo (apenas 8 pacientes não se declararam dependentes de álcool e de fumo) e das perdas inerentes ao tratamento e doença tratada, não foi possível.

A literatura sobre microrganismos bucais em pacientes irradiados praticamente se limita a patógenos entéricos e leveduras bucais, pouco existindo sobre o efeito da radioterapia na microbiota anaeróbia bucal. Outro aspecto que dificulta maiores discussões no momento se deve ao fato de que a maioria dos pacientes ora estudados apresenta prótese total ou parcial e poucos estudos avaliam o papel de microrganismos periodontais nesses pacientes, embora essas bactérias sejam capazes de colonizar a superfície de dispositivos protéticos (KEEVIL et al., 1987).

A patofisiologia da mucosite induzida por radioterapia está relacionada com a liberação de citocinas e a atividade imunológica local. Assim, microrganismos, como *P. gingivalis*, capazes de induzir a liberação de numerosos compostos biologicamente ativos, podem contribuir para a desorganização da resposta local e sistêmica do hospedeiro, criando condições para a manutenção do quadro inflamatório originalmente causado pelos danos da radioterapia.

Nesse sentido, a mucosite oral parece ser a consequência de uma série de eventos biológicos que começam na submucosa e progride no sentido do epitélio. Durante a primeira fase, citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), são produzidos mediante uma resposta local, seguido de apoptose e dano celular. A dinâmica cascata biológica resulta em prejuízo para a mucosa, freqüentemente apresentando-se como úlceras. Um exsudato de fibrina contendo bactérias - também chamado de pseudomembrana - abrange a úlcera. Microrganismos penetram na submucosa, onde ativam macrófagos no infiltrado; esses macrófagos produzem citocinas adicionais. Estas e outras citocinas relacionadas são responsáveis por causar dano tecidual direto, dilatação dos vasos sanguíneos e outros efeitos inflamatórios, os quais aumentam a deposição de produtos citotóxicos na mucosa. A segunda fase (fase epitelial) está relacionada com a anterior em que agentes citotóxicos inibem a replicação do epitélio levando a uma reduzida capacidade de renovação do tecido. Assume-se que a terceira fase (úlcera com infecção) deriva do trauma sobre o epitélio, que neste momento é mais fino e atrófico devido à quimioterapia. Além disso, é postulado que a colonização bacteriana das superfícies ulceradas aumenta a quantidade de citocinas pró-inflamatórias na mucosa, o que facilita uma infecção sistêmica no hospedeiro.

A reparação ocorre após 2 a 3 semanas em pacientes que não recebem mais a infecção secundária, como a presença de *P. gingivalis*, que pode retardar cicatrização de lesões nas mucosas. Úlceras maiores e mais profundas geralmente exigem mais tempo para a cicatrização (VOLPATO et al., 2007).

P. gingivalis está associada a doenças de caráter endógeno, como as periodontites (FENG e WEINBERG, 2006). Seu metabolismo proteolítico é capaz de degradar os principais componentes do tecido conjuntivo, permitindo a invasão para planos teciduais mais profundos (BROOK, 2008), além de gerar compostos tóxicos de pequeno peso molecular que retardam o reparo tecidual e podem facilitar a instalação de outros microrganismos no processo infeccioso, como tão freqüentemente observado nas infecções polimicrobianas de cabeça e pescoço (HULL e CHOW, 2007; BROOK, 2008).

As populações desse anaeróbio se mostram significativamente mais elevadas nos indivíduos com periodontite. Dados com o real-time PCR evidenciam a presença de *P. gingivalis* em 28,57% dos sadios, e no mesmo número de pacientes com periodontite. Em outros grupos, como descrito na literatura (MAYANAGI et al., 2004; COLOMBO et al., 2005; DAHLÉN e LEONHARDT, 2006; XIMENEZ-FYVIE et al., 2006; BOUTAGA et al., 2006; HINTAO et al., 2007), a ocorrência desse anaeróbio varia de 80% a 96% dos pacientes com periodontite crônica, podendo estar presente em mais de 80% dos sítios periodontais em pacientes com periodontite agressiva generalizada (CARVALHO et al., 2009).

De uma forma geral, os dados do presente trabalho mostram um aumento na população desse microrganismo com o desenvolvimento da radioterapia e seus efeitos colaterais, particularmente a xerostomia e a mucosite. Entretanto, os dados estatísticos sugerem que essa associação não se origina do efeito do microorganismo sobre o hospedeiro, mas que, os efeitos da radioterapia acabam por criar condições que favorecem a colonização de outras áreas na cavidade bucal, a partir do biofilme dental.

O aumento da população desse microrganismo Gram-negativo pode estar associado a uma progressiva deterioração das condições bucais e da debilidade orgânica associada ao câncer e seu tratamento radioterápico. As condições de higiene bucal bastante desfavoráveis podem colaborar para o estabelecimento desses microrganismos exógenos na cavidade bucal. Procurou-se, com o desenvolvimento da terapia, aprimorar as condições de

higiene bucal dos pacientes, mas a grande maioria dos mesmos apresentava uma modesta capacidade de realizar a própria higiene, particularmente quando a mucosite se desenvolvia, o que infelizmente correspondia ao período em que deveriam mais se dedicar.

A resistência aos principais antimicrobianos tem se expandido consideravelmente em anos recentes (BOYONOVA et al., 2006; WYBO et al., 2007), tornando complexa a prescrição dessas drogas na ausência de exames laboratoriais, como o antibiograma. A grande maioria dos estudos sobre o desenvolvimento de microrganismos resistentes tem sido realizada em países desenvolvidos e muito pouco é conhecido sobre os padrões de susceptibilidade de bactérias anaeróbias obrigatórias originárias de países em desenvolvimento (AL-HARONI et al., 2006), os quais possuem características socioeconômicas e culturais que facilitam a seleção e disseminação de linhagens bacterianas resistentes, como a automedicação e o abuso de drogas com atividade antimicrobiana (OKEKE et al., 1999). Nesse sentido, é notório o fenômeno da automedicação no nosso país.

A utilização de drogas antimicrobianas no tratamento das infecções de cabeça e pescoço em pacientes irradiados por vezes esbarra na problemática da seleção de microrganismos resistentes aos fármacos empregados e, principalmente, na modesta capacidade de reparo e de resposta imunológica que muitos pacientes possuem. Por outro lado, estabilização das condições teciduais, particularmente nas infecções periodontais, não exige a eliminação da maioria dos microrganismos envolvidos com essas patologias (XAJIGEORGIOU et al., 2006), de forma que nesses pacientes irradiados, o emprego de antibióticos e outros antimicrobianos apenas atuaria para impedir a disseminação de processos infecciosos pré-existentes.

No tratamento das infecções anaeróbias mistas, por vezes são empregadas drogas do grupo dos nitroimidazóis, como o metronidazol, lincosaminas, tetraciclina e, principalmente, drogas β -lactâmicas (NEEDLEMAN et al., 2000; VAN WINKELHOFF et al., 2005). Drogas como a tetraciclina, que produzem resultados satisfatórios tanto com seu uso tópico quanto sistêmico (MOMBELLI et al., 2001; PAVIA et al., 2003), também são rotineiramente empregadas como automedicação, o que limita sua eficácia.

Dentre os microrganismos bucais, os estreptococos são os que apresentam maior resistência a esse fármaco, mas entre os Gram-negativos os níveis de resistência também têm se elevado (BOSCO et al., 2008).

A análise da resistência a antimicrobianos deve considerar a importância do grupo microbiano estudado e da patologia em questão, bem como o papel representado pela droga testada no tratamento, justificando o monitoramento dos níveis de resistência a antimicrobianos apresentado pelos principais patógenos (PINHEIRO et al., 2004; VAN WINKELHOFF et al., 2005). Desta forma, enquanto níveis mais elevados de resistência à tetraciclina, limitam seu uso sistêmico, a importância dessa resistência em áreas da saúde é limitada, em função de sua pequena relevância no tratamento moderno de infecções mais sérias. Por outro lado, drogas como as penicilinas, cefalosporinas, lincosaminas e os nitroimidazóis, muito utilizadas no tratamento de infecções graves causadas por anaeróbios (PUMBWE et al., 2007), merecem atenção e monitoramento.

Para os β -lactâmicos, o principal mecanismo microbiano de resistência depende da produção de enzimas capazes de degradar essas drogas, as β -lactamases, que, entre os anaeróbios bucais, são mais freqüentemente produzidas pelos gêneros *Fusobacterium* e *Prevotella* (NYFORS et al., 1999; HERRERA et al., 2000; IWAHARA et al., 2006), embora permanecem sensíveis ao metronidazol (AL-HARONI et al., 2006). Os resultados listados na tabela 12 estão de acordo com esses dados.

A despeito do uso irresponsável desses fármacos por muitos profissionais de saúde e automedicação, todas as drogas testadas se mostraram eficazes frente aos isolados de *P. gingivalis*, como também relatado na literatura (LAKHSSASSI et al., 2005; JACINTO et al., 2006; KURIYAMA et al., 2007).

A resistência às tetraciclinas, normalmente codificada pelos genes *tet*, é a mais disseminada entre os principais fármacos de importância na área de saúde (PATTERSON et al., 2007). Porém, os anaeróbios Gram-negativos geralmente são sensíveis a essa droga (LAKHSSASSI et al., 2005), excetuando-se bactérias do grupo do *Bacteroides fragilis*. Embora marcadores de resistência a essa droga tenham sido descrito em

microrganismos bucais e mesmo entre isolados de *P. gingivalis* (OLSVIK et al. 1995, LACROIX e WALKER 1996, OLSVIK et al. 1996; ROBERTS 1996), não foram observados microrganismos resistentes a essa droga.

A literatura vem sugerindo que a capacidade de agressão, como a invasividade, de isolados de *P. gingivalis* varia de acordo com o tipo fimbrial do microrganismo, onde os portadores do gene fimA tipo II seriam mais agressivos e, portanto, associados às enfermidades de natureza infecciosa, como as periodontites (NAKAGAWA et al., 2002b; MIURA et al., 2004; ENERSEN et al., 2008). Esses dados estão de acordo com os resultados do presente estudo, que mostraram a predominância do tipo II sobre os demais em todos os momentos de coleta das amostras clínicas, tanto nos indivíduos com gengivite, quanto nos portadores de periodontite.

7. Conclusões

Os resultados do presente estudo, uma vez analisados, permitiram as seguintes conclusões:

a) *P. gingivalis* se mostrou freqüente na cavidade bucal dos pacientes irradiados, particularmente no biofilme subgengival e, em menor extensão, biofilme supragengival, tendo suas populações e prevalência aumentadas durante o tratamento radioterápico;

b) Esse anaeróbio foi estatisticamente associado à perda óssea;

c) a ocorrência de xerostomia e desenvolvimento de mucosite parecem estimular a colonização da cavidade bucal de pacientes irradiados por *P. gingivalis*;

d) os isolados dessa espécie foram sensíveis ou moderadamente sensíveis a todos os antimicrobianos testados;

e) o genótipo fimbrial *fimA* tipo II foi o mais freqüentemente detectado nos pacientes estudados, independentemente das condições periodontais e do tratamento instituído para o câncer de cabeça e pescoço.

8. Referências

- 1) AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v. 25, n. 4, p. 229-35, 1975.
- 2) AL-HARONI, M. H.; SKAUG, N.; AL-HEBSHI, N. N. Prevalence of subgingival bacteria resistant to aminopenicillins and metronidazole in dental patients from Yemen and Norway. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 27, p. 217-23. 2006.]
- 3) AMANO, A., NAKAGAWA, I., KATAOKA, K., MORISAKI, I. & HAMADA, S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1426-1430, 1999.
- 4) ARORA, R.; GUPTA, D.; CHAWLA, R.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; PRASAD, J.; SINGH, S.; SAMANTA, N.; SHARMA, R. K. Radioprotection by plant products: present status and future prospects **Phytother. Res.** v. 19, p. 1-22, 2005.
- 5) BELAAOUAJ, A.; LAPOUMEROULIE, C.; CANICA, M. M.; VEDEL, G.; NEVO, T. P.; RAGOPAL KRISHNAMOORTHY; PAUL, G. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). **FEMS Microbiol. Letters**, v. 120, p. 75-80, 1994.
- 6) BENSANDOUN, R.-J.; MAGNÉ, N.; MARCY, P.-Y.; DEMARD, F. Chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 258, p. 481-7, 2001.
- 7) BONAN, P. R. F.; LOPES, M. A.; ALVES, F. A.; ALMEIDA, O. P. Aspectos clínicos, biológicos, histopatológicos e tratamentos propostos para mucosite oral induzida por radioterapia: revisão da literatura. **Rev. Brasileira de Cancerologia**. v. 51, p. 235-242, 2005.
- 8) BOSCO, J. M. D.; OLIVEIRA, S. R. O.; BOSCO, A. F.; SCHWEITZER, C. M.; GAETTI-JARDIM JR, E. Influence of local tetracycline on the microbiota of alveolar osteitis in rats. **Braz. Dental J.**, v. 19, p. 119-23, 2008.

- 9) BOTERO, J. E.; CONTRERAS, A.; LAFAURIE, G.; JARAMILLO, A.; BETANCOURT, M.; ARCE, R. M. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. **J. Periodontol.**, v. 78, p. 696-704, 2007.
- 10) BOUTAGA, K.; SAVELKOUL, P. H. M.; WINKEL, E. G.; WINKELHOFF, A. J. V. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. **J. Periodontol.**, v. 78, n.1, p. 79-86, 2007.
- 11) BOYANOVA, L.; KOLAROV, R.; GERGOVA, G.; DELIVERSKA, E.; MADJAROV, J.; MARINOV, M.; MITOV, I. Anaerobic bacteria in 118 patients with deep-space head and neck infections from the University Hospital of Maxillofacial Surgery, Sofia, Bulgaria. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1285-9, 2006.
- 12) BROOK, I. Microbiology and management of joint and bone infections due to anaerobic bacteria. *J. Orthop. Sci.*, v. 13, p. 160-9, 2008.
- 13) BROWN, L. R.; DREIZEN, S.; HANDLER, S.; JOHNSTON, D. A. Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. **J. Dent. Res.**, v. 40, n.6, 740-750, 1975.
- 14) CERCHIARI, D. P. et al. Burning mouth syndrome: etiology. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 72, p. 419-24, 2006.
- 15) COLOMBO, A. P. et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 360-369, 2002.
- 16) COLOMBO, A. P. V.; TELES, R. P.; TORRES, M. C.; SOUTO, R.; ROSALÉM, W.; MENDES, M. C. S.; UZEDA, M. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9 month results. **J. Periodontol.**, v. 76, p. 778-784, 2005.
- 17) D'AIUTO, F. The new era of "perio-focal infection". **Oral Diseases**, v. 13, p. 507, 2007

- 18) DAHLÉN, G., LEONHARDT, A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.21, p. 6-11, 2006.
- 19) DOGAN, B.; ANTINHEIMO, J.; CETINER, D.; BODUR, A.; EMINGIL, G.; BUDUNELI, E.; UYGUR, C.; FIRATLI, E.; LAKIO, L.; ASIKAINEN, S. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 803-814, 2003.
- 20) DUNCAN, G. G. EPSTEIN, J. B.;TU, D.; SAYED, S. E.; BEZJAK, A.; OTTAWAY, J.; PATER, J. Quality of life, mucositis, and xerostomia from radiotherapy for head and neck cancers: a report from the ncic ctg hn2 randomized trial of an antimicrobial lozenge to prevent mucositis. **Head Neck**, v. 27, p. 421-8, 2005.
- 21) EPSTEIN, J. B.; MEIJ, E.; LUNN, R.; LE, N.; MOORE, P. S. Effects of compliance with fluoride gel application on caries and caries risk in patients after radiation therapy for head and neck cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 82, p. 268-75, 1996.
- 22) EPSTEIN, J. B.; SILVERMAN, S. JR.; PAGGIARINO, D. A. Benzydamine oral rinse was effective, safe, and well tolerated for prophylactic treatment of radiation-induced oral mucositis. **Cancer**, v. 92, p. 875-85, 2001.
- 23) FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontology** 2000, v.40, n.1, p. 50-76, 2006.
- 24) FIDLER, P.; LOPRINZI, C. L.; O'FALLON, J. R.; LEITCH, J. M.; LEE, J. K.; HAYES, D. L.; NOVOTNY, P.; SCHUTJER, D. C.; BARTEL, J.; MICHALAK, J. C. Prospective evaluation of a chamomile mouthwash for prevention of 5-Fu-induced oral mucositis. **Cancer**, v. 77, p. 522-5, 1996.
- 25) FIGUEIREDO, R. L. Q. **Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas na cavidade bucal de indivíduos submetidos à radioterapia para tratamento de lesões de cabeça e pescoço**, 2003, 90f., Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2003.

- 26) GAETTI-JARDIM JR, E.; ZELANTE, F.; AVILA-CAMPOS, M. J. Oral species of *Fusobacterium* from human and environmental samples. **J. Dent.**, v. 24, p. 345-348, 1996.
- 27) GAETTI-JARDIM JR; NAKANO, V.; WAHASUGUI, T. C.; CABRAL, F. C.; GAMBA, R.; AVILA-CAMPOS, M. J. Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of hiv-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, p. 257-61, 2008.
- 28) GIRAUD-MORIN, C.; MADINIER, I.; FOSSE, T. J. Sequence analysis of *cfxA2*-like β -lactamases in *Prevotella* species. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, 1293-6, 2003.
- 29) GOMES B. P. F. A.; PINHEIRO, E. T.; GADE-NETO, C. R.; SOUSA, E. L. R.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 71-6. 2004.
- 30) GUEBUR, M. I.; RAPOPORT, A.; SASSI, L. M.; OLIVEIRA, B. V.; PEREIRA, J. C. G.; RAMOS, G. H. A. Alterações de fluxo salivar não estimulado em pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca e orofaringe submetidos à radioterapia por hiperfracionamento. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 50, p. 103-8, 2004.
- 31) HANDSCHEL, J.; SUNDERKÖTTER, C.; PROTT, F. J.; MEYER, U.; KRUSE-LÖSLER, B.; JOOS, U. Increase of RM 3/1- positive macrophages in radiation induced oral mucositis. **J. Pathol.**, v. 193, p. 242-7, 2001.
- 32) HANSEN, T. et al., Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates- histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis, **Journal Oral Pathology Medicine**, v.35, p. 155-60, 2006a.
- 33) HANSEN, T.; KUNKEL, M.; KIRKPATRICK, C.; WEBER, A. *Actinomyces* in infected osteoradionecrosis- underestimated? **Human Pathol.**, v. 37, p. 61-7, 2006b.
- 34) HENRIQUES, I. S.; FONSECA, F.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M. J.; CORREIA, A. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase

- genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. **Res. Microbiol.**, v. 157, p. 938-947, 2006.
- 35) HERRERA, D.; CONTRERAS, A.; GAMONAL, J.; OTEO, A.; JARAMILLO, A.; SILVA, N.; SANZ, M.; BOTERO, J.; LEON, R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p. 106-113, 2008.
 - 36) HERRERA, D.; VAN WINKELHOFF, A. J.; DELLEMIJN-KIPPUW, N.; WINKEL, E. G.; SANZ, M. Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival flora of adult patients with periodontitis: a comparison between Spain and Netherlands. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, p. 520-5, 2000.
 - 37) HINTAO J. et al. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, p. 175-181, 2007.
 - 38) HULL, M. W.; CHOW, A. W. Indigenous microflora and innate immunity of the head and neck. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 21, p. 265-282, 2007.
 - 39) IWAHARA, K.; KURIYAMA, T.; SHIMURA, S.; WILLIAMS, D. W.; YANAGISAWA, M.; NAKAGAWA, K.; KARASAWA, T. Detection of *cfxA* and *cfxA2*, the β -lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 172-6, 2006.
 - 40) JACINTO, R. C.; GOMES, B.P.F. A.; SHAH, H.N.; FERRAZ, C.C.; ZAIA, A.A.; SOUZA-FILHO, F. J. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. **Int. Endod. J.**, v. 39, p. 62-70, 2006.
 - 41) JERVOE-STORM P-M.; ALAHDAB, H.; SEMAAN, E.; FIMMERS, R.; JEPSEN, S. Microbiological outcomes of quadrant versus full-mouth root planing as monitored by real-time PCR. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, p. 156-63, 2007.

- 42) JHAM, B.C.; FREIRE, A.D.S. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço, **Rev. Brás. Otorrinolaringol.** , v. 72, n. 5, p. 704-8, 2006.
- 43) JHAM, B.C.; FRANÇA, E. C.; REIS, R. R.; SANTOS, V. R. Candida oral colonization and infection in Brazilian patients undergoing head and neck radiotherapy: a pilot study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 103, p. 355-8, 2007.
- 44) KEEVIL, C.W.; BRADSHAW, D. J.; DOWETT, A. B.; FEARY, T. W. Microbial film formation : dental plaque deposition on acrylic tiles using continuous culture techniques. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 62, p. 129-38, 1987.
- 45) KOGA, D. H.; SALVOJOLI, J.V.; ALVES, F. A. Dental extractions and radiotherapy in head and neck oncology: review of the literature. **Oral Dis.**, v.14, p. 40-4, 2008.
- 46) KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D. W.; YANAGISAWA, M.; IWAHARA, K.; SHIMIZU, C.; NAKAGAWA, K.; YAMAMOTO, E.; KARASAWA, T. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, p. 285-8, 2007.
- 47) LACROIX, J.-M.; WALKER, C. B. Detection and prevalence of the tetracycline resistance determinant Tet Q in the microbiota associated with adult periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 11, 282-8, 1996.
- 48) LAFAURIE, G. I. ; CONTRERAS, A.; BARÓN, A.; BOTERO, J.; MAYORGA-FAYAD, I.; JARAMILLO, A.; GIRALDO, A.; GONZÁLEZ, F.; MANTILLA, S.; BOTERO, A.; ARCHILA, L. H.; DÍAZ, A.; CHACÓN, T.; CASTILLO, D. M.; BETANCOURT, M.; AYA, M. D. R.; ARCE, R. Demographic, clinical and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. **J. Periodontol.**, v. 78, p. 629-39, 2007.
- 49) LEUNG, W.K., et al., Oral colonization of aerobic and facultative anaerobic Gram-negative rods and cocci in irradiated, dentate, xerostomic individuals, **Oral Microbiol. Immunol.**, v.16, n. 1-9, 2001.

- 50) MAYANAGI, G.; SATO, T.; SHIMAUCHI, H.; TAKAHASHI, N. Detection frequency of periodontitis associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.19, p. 379-85, 2004.
- 51) MÖLLER, A. J. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. **Odontol. Tidskr.** v. **74**, (Suppl, p. 1-138), 1966.
- 52) MOMBELLI, A.; FELOUTZI, A.; BRAGGER, U.; LANG, N. P. Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline. **Clin Oral Impl Res.**, v. 12, p. 287-94, 2001.
- 53) MONTEIRO, L. et al., Osteorradionecrose dos maxilares, **Rev. Port. Estomatol. Méd. Dent. Cirur. Maxilofac.**, v. 46, n.1, p. 49-62, 2005.
- 54) NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; KIMURA, R. K.; NAKAMURA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1909-1914, 2000.
- 55) NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; OHARA-NEMOTO, Y.; ENDOH, N.; MORISAKI, I.; KIMURA, S.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Identification of a new variant of *fimA* gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. **J. Periodont. Res.**, v. 37, p. 425-32, 2002b.
- 56) NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Sixth Edition:Approved Standard M11-A6. NCCLS Wayne, USA, 2004.
- 57) NEEDLEMAN, I. G.; COLLINS, A. M.; MOLES, D. R. Periodontal flap surgery with 25% metronidazole gel. Clinical outcomes. **J Clin Periodontol.**, v. 27, p. 187-92, 2000.
- 58) NG, L-K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline-resistant genes. **Mol. Cell. Probes**, v. 15, p. 209-215, 2001.
- 59) NYFORS, S.; KONONEM, E.; TAKALA, A.; JOUSIMIES-SOMER, H. β -lactamase production by oral Gram-negative species in infants in

- relation to previous antimicrobial therapy. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.43, p. 1591-4, 1999.
- 60) OKEKE, I. N.; LAMIKANRA, A.; EDELMAN, R. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. **Emerg Infect. Dis.**, v. 5, p.18-27, 1999.
 - 61) OKUNO, S. H.; FOOTE, R. L.; LOPRINZI, C. L.; GULAVITA, S. A randomized trial of nonabsorbable antibiotic lozenge given to alleviate radiation-induced mucositis. **Cancer**, v. 79, p. 2193-9, 1997.
 - 62) OLSVIK, B.; FLYNN, M. J.; TENOVER, F. C. ; SLOTS, J.; OLSEN, I. Tetracycline resistance in *Prevotella* isolates from periodontally diseased patients is due to the *tet(Q)* gene. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 5, 304-8, 1996.
 - 63) OLSVIK, B.; HANSEN, B. F.; TENOVER, F. C.; OLSEN, I. Tetracycline-resistant microorganisms recovered from patients with refractory periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 22, 391-6, 1995.
 - 64) OLSVIK, B.; OLSEN, I.; TENOVER, F. C. Detection of *tet(M)* and *tet(O)* using the polymerase chain reaction in bacteria isolated from patients with periodontal disease. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.10, 87-92, 1995.
 - 65) PAPAPANOU, P. N.; TEANPAISAN, R.; OBIECHINA, N. S.; PITHPORNCHAIYAKUL, W.; PONGPAISALI, S.; PISUITHANAKAN, S.; BAELUM, V.; FEJERSKOV, O.; DAHLEN, G. Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 110, p. 345-352, 2002.
 - 66) PATTERSON, A. J.; COLANGELLI, R.; SPIGAGLIA, P.; SCOT, K. P. Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental samples assessed by macroarray detection. **Environ Microbiol.**, v. 9, p. 703-15, 2007.
 - 67) PAVIA, M.; NOBILE, C. G. A.; ANGELILLO, I. F. Meta-analysis of local tetracycline in treatment chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 916-32, 2003.

- 68) PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. **Int Endod. J.**, v. 37, p. 756-63, 2004.
- 69) PUMBWE, L.; WAREHAM, D. W.; ADUSE-OPOKU, J.; BRAZIER, J. S.; WEXIER, H. M. Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, p. 183-9, 2007.
- 70) RAMFJORD, S. P. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 44, n.2, p. 66-77, 1959.
- 71) RAMIREZ-AMADOR, V.; SILVERMAN, S.; MAYER, P.; TYLER, M.; QUIVEY, J. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 84, p. 49-53, 1997.
- 72) REDDING, S.W.; DAHIYA, M. C.; KIRKPATRICK, W. R.; COCO, B. J.; PATTERSON, T. F.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G.; THOMAS, C. R. *Candida glabrata* is an emerging cause of oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation for head and neck cancer, **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 97, p. 47-52, 2004.
- 73) ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 19, 1-24, 1996.
- 74) SONIS, S. T. et al. Oral Mucositis and the Clinical and Economic Outcomes of Hematopoietic Stem-Cell Transplantation **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, 2001.
- 75) SPETCH, L. Oral complications in the head and neck irradiated patient. Introduction and scope of th problem. **Supp. Care Dent.**, v. 10, p. 36-40, 2002.
- 76) SPIJKERVET, F. K.; VAN SAENE, H. K. F.; PANDERS, A. K.; VERMEY, A.; MEHTA, D. M. Mucositis prevention by selective elimination of oral flora in irradiated head and neck cancer patients. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 19.p 486-9.1990.

- 77) SPOLIDORIO, D.M.P.; SPOLIDORIO, L. C.; BARBEIRO, R. H.; HÖFLING, J. F.; BERNARDO, W. L. C.; PAVAN, S. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Candida* sp e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia, **Pesq. Odontol. Bras.**, v.15, p. 354-8, 2001.
- 78) STORE, G., OLSEN, I., DNA-DNA hybridization demonstrates multiple bacteria in osteoradionecrosis, **J. Int. Oral Maxillofacial Surg.**, v. 34, p. 193-6, 2005a.
- 79) STORE, G., OLSEN, I., Scanning and transmission electron microscopy demonstrates bacteria in osteoradionecrosis, **J. Oral Maxillof. Surg.**, v.34, p. 777-81, 2005b.
- 80) SUDA, R.; KOBAYASHY, M.; NANBA, R.; IWAMARU, M.; HAYASHI, Y.; LAI, C. H.; HASEGAWA, K. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J. Periodont.* V. 75, p. 1084-1089, 2004.
- 81) VAN DER VELDEN, U.; ABBAS, F.; ARMAND, S.; LOOS, B. G.; TIMMERMAN, M. F.; VAN DER WEIJDEN, G. A.; VAN WINKELHOFF, A. J.; WINKEL, E. G. Java Project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, p. 540-8, 2006.
- 82) VAN WINKELHOFF, A. J.; HERRERA, D.; OTEO, A.; SANZ, M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p. 893-8, 2005.
- 83) VENESS,M.J.;FOROUDI; GEBSKI; TIMMS; SATHIYASEELAN; CAKIR; TIVER. Use of topical misoprostol to reduce radiation-induced mucositis: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Austr. Radiol.**, v. 50, p. 468-74, 2006.
- 84) VISSINK, A.; JANSMA, J.; SPIJKERVET, F. K. L.; BURLAGE, F. R.; COPPES, R. P. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, p. 199-212, 2003.

- 85) VOLPATO, L. E. R.; SILVA, T. C.; OLIVEIRA, T. M.; SAKAI, V. T.; MACHADO, M. A. A. M. Radiation therapy and chemotherapy-induced oral mucositis. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 73, p. 562-68, 2007.
- 86) WIJERS, O. B.; LEVENDAG, P.C.; HARMS, E. R. E.; GAN-TENG, A. M.; SCHMITZ, P. I. M.; HENDRIKS, W. D. H.; WILMS, E. B.; VAN DER, E. H.; VISCH, L. L. Mucositis reduction by selective elimination of oral flora in irradiated cancers of the head and neck: a placebo controlled double-blind randomized study. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 50, n. 2, p. 343-52, 2001.
- 87) WORTHINGTON, H. V.; CLARKSON, J. E.; EDEN, O. B. Interventions for treating oral mucositis for patients with cancer receiving treatment (Cochrane review). In: The Cochrane Library. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2004.
- 88) WU, Y-M.; YAN, J.; CHEN, L-L.; GU, Z-Y. Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. **J. Zhejiang Univ. Science B**, v.8, n. 2, 121, 2007.
- 89) WYBO, I.; PIÉRARD, D.; VERSCHRAEGEN, I.; REYNDERS, M.; VANDOORSLAER, K.; CLAEYS, G.; DELMÉE, M.; GLUPCZYNSKI, Y.; GORDTS, B.; IEVEN, M.; MELIN, P.; STRUELENS, M.; VERHAEGEN, J.; LAUWERS, S. Third Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, p. 132-9, 2007.
- 90) XAJIGEORGIOU, C.; SAKELLARI, D.; SLINI, T.; BAKA, A.; KONSTANTINIDIS, A. Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, p. 254-64, 2006.
- 91) XIMENEZ-FYVIE, L. A.; JACOBO-SOTO, V.; LARA-CORDOBA, M.; SANCHEZ-VARGAS, L. O.; ALCANTARA-MARURI, E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects : chronic periodontitis and periodontal health. **J. Periodontol.**, v. 77, p. 460-471, 2006.

Descrição das Atividades Acadêmicas, Científicas e Profissionais Desenvolvidas

Aline Martucci Geraldês

1. Formação Acadêmica

- Graduação em odontologia na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, início em fevereiro de 2007, término previsto para dezembro de 2010.

2. Formação Complementar

- 2009-2009: **Curso de curta duração em “Concursos Públicos em odontologia: o que devemos estudar?”** Ministrado pelo Professor **Ms. Renato Uetenabara**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. Carga de 4 horas.
- 2009-2009: **Curso de curta duração em “Tratamentos multidisciplinares na busca da harmonia estética”** Ministrado pelo Professor **Dr. Sérgio Kiyoshi Ishikiriama**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. Carga de 4 horas
- 2008-2008 **Curso de curta duração em “Atualização e conceitos sobre câncer bucal”**. Faculdades integradas de Santa Fé do Sul. Carga de 5 horas.
- 2008-2008: **Curso de extensão da Proex “Otimização de procedimentos restauradores”**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- UNESP. Carga de 8 horas.
- 2008-2008: **Curso de curta duração em “Estética previsível com sistemas cerâmicos livres de metal: InCeran, Procera, Empress e Cerec”** Ministrado pelo Professor **Dr. Marco Antonio Passos**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. Carga de 4 horas.
- 2008-2008: **Curso de curta duração em “Clareamento Dental imediato”**. Ministrado pelo Professor **Dr. Oscar Barreiros de Carvalho Júnior**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. Com carga de 4 horas.

- 2007-2007 : **Curso de curta duração em “Tratamento das Patologias Bucais”**. Interação entre Estomatologia, Radiologia, Patologia e Cirurgia” Ministrado pelo Professor **Dr. Elio Hitoshi Shinohara**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.
- 2007-2007 : **Curso Teórico de curta duração em “Anatomia e Escultura Dental”**, ministrado pelo **Prof. Dr Miguel Carlos Madeira**, num total de 4 horas.
- 1998-2004 : **Curso de Inglês em nível avançado** na escola Together English School, Bálamo- SP.

3. Produção Bibliográfica

- COLENCI, R; **GERALDES, AM**; MELO, ME; SOUSA, FRN; GAETTI-JARDIM, EC; GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E. Capuz pericoronário como reservatório de patógenos periodontais. VI Encontro de Estomatologia, Araçatuba. Realizado nos dias 25, 26 e 27 de outubro de 2007.
- **GERALDES, AM**; GAETTI-JARDIM, E; NETO, RL; TIMENETSKY, J; OBIAGERI, NF. Mollicutes na cavidade bucal: distribuição em oito grupos étnicos no Brasil e de uma comunidade nigeriana. 22ª Jornada odontológica de Bauru.
- **GERALDES, AM**; BUSO, MM; SILVA, VC; MECA, LB; SOUZA, FRN; GAETTI-JARDIM, E. Ocorrência de leveduras na microbiota bucal de pacientes submetidos à radioterapia. VII Encontro de estomatologia, Araçatuba. 23, 24 e 25 de outubro de 2008.
- **GERALDES, AM**; MELO, ME; MARCELINO, SL; CAMPOS, MJA; GAETTI-JARDIM, E. Sistema cardiovascular e mollicutes: associação em placas ateromatosas. IX Jornada Acadêmica e VI jornada de pós graduação do curso de odontologia da fundação municipal de educação e cultura de Santa Fé do Sul. 15 e 16 de setembro de 2008
- **GERALDES, AM**; MEDEIROS, ACC; KINA, M; KINA, JR. Restaurações adesivas diretas em dentes posteriores utilizando a técnica de matriz oclusal: relato de caso clínico. Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. 19 a 23 de maio de 2009.

- **GERALDES, AM**; GALLO, AJ; MELO, ME; GAETTI-JARDIM, E; Classe *Mollicutes* ou microrganismos fantasmas. Relação com infecções periodontais, articulares e alterações ateromatosas nas coronárias. . Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP. 19 a 23 de maio de 2009.
- GALLINARI, MO; FAVERANI, LP; **GERALDES, AM**; IZZA, PN; MELO, ME; GAETTI-JARDIN, E. Ocorrência de *Porphyromonas gingivaleis* e *Prevotella intermédia* na microbiota bucal de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de lesões malignas de cabeça e pescoço. Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP. 19 a 23 de maio de 2009.

4. Participação em Eventos

- Participação como Membro Efetivo do **VI Encontro de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP**, nos dias 25 , 26 e 27 de outubro de 2007.
- Participação como Membro Efetivo do **IX Jornada Odontológica, IX jornada acadêmica e VI jornada de pós graduação de Santa Fé do Sul**, nos dias 15, 16, 17, 18 e 19 de setembro de 2008.
- Participação como Membro Efetivo do **VII Encontro de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP**, nos dias 23, 24 e 25 de outubro de 2008.
- Participação como Membro Efetivo da **28ª Jornada Acadêmica de Odontologia de Araçatuba –UNESP**, nos dias 14, 15, 16 e 17 de maio de 2008.
- Participação como Membro Efetivo da **22ª Jornada Odontológica de Bauru- Universidade de São Paulo** , nos dias 13, 14, 15 e 16 de maio de 2009.
- Participação como Membro Efetivo da **29ª Jornada Acadêmica de Araçatuba e 5º simpósio de pós-graduação UNESP**, nos dias 19, 20, 21, 22 e 23 de maio de 2009.

5. Organização de Eventos

- **VI Encontro de Estomatologia**, comissão científica, 2007
- **VII Encontro de Estomatologia**, comissão científica, 2008
- **29ª Jornada Acadêmica de Odontologia de Araçatuba e 5º Simpósio de pós-graduação**, comissão organizadora, 2009

6. Vínculo Institucional

- **Estágio técnico junto à disciplina de Microbiologia e Imunologia** do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob orientação do Profª Adjunto Elerson Gaetti Jardim Jr., a partir de março de 2008.
- **Estágio** de Treinamento de Férias, **em Microbiologia**, pelo Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com duração de 100 horas, sob orientação do Prof Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior, de dezembro de 2007 a fevereiro de 2008.
- **Estágio no programa de atenção odontológica a gestante** junto ao departamento de Odontologia Infantil e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, com duração de março a novembro de 2007.
- **Iniciação científica:** Ocorrência de *Porphyromonas gingivalis* na microbiota bucal de pacientes submetidos á radioterapia para tratamento de lesões malignas de cabeça e pescoço. **Processo FAPESP 08/53297-2**
- **Iniciação científica:** Influência do clareamento dental sobre a microbiota bucal: avaliação através de métodos convencionais e moleculares. **Processo FAPESP 08/53297-2**