


unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Odontologia de Araraquara –
UNESP

Telma Blanca Lombardo Bedran

**“Efeito da terapia periodontal na microbiota
subgengival. Parâmetros clínicos e microbiológicos
comparativos de PCR semi quantitativo e PCR em
tempo real”**

ARARAQUARA

2010

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**Faculdade de Odontologia de Araraquara –
UNESP**

Telma Blanca Lombardo Bedran

**“Efeito da terapia periodontal na microbiota
subgengival. Parâmetros clínicos e microbiológicos
comparativos de PCR semi quantitativo e PCR em
tempo real”**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Odontologia –
Área de Periodontia da Faculdade de
Odontologia de Araraquara da
Universidade Estadual Paulista, para o
título de mestre em Odontologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

Co-Orientadora:

Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

ARARAQUARA

2010

Bedran, Telma Blanca Lombardo

Efeito da terapia periodontal na microbiota subgingival. Parâmetros clínicos e microbiológicos comparativos de PCR semi quantitativo e PCR em tempo real / Telma Blanca Lombardo Bedran.– Araraquara: [s.n.], 2010.

100 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora : Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

Co-orientador: Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

1. Reação em cadeia da polimerase – Métodos 2. Porphyromonas gingivalis 3. Porphyromonas endodontalis 4. Periodontite crônica 5. Tannerella Forsythia I. Título

Telma Blanca Lombardo Bedran

“Efeito da terapia periodontal na microbiota subgengival. Parâmetros clínicos e microbiológicos comparativos de PCR semi quantitativo e PCR em tempo real”

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do título de Mestre:

Presidente e orientador: Profa. Dra. Denise Madalena P. Spolidorio

2º examinador: Profa. Dra. Poliana Duarte

3º examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 26 de abril de 2010.

DADOS CURRICULARES

Telma Blanca Lombardo Bedran

Nascimento 20 de janeiro de 1985- Rio Claro – SP

Filiação Felipe Bedran Filho

Telma Cristina Lombardo Bedran

2003-2006 Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara-
UNESP

2007-2008 Especialização em Periodontia
Escola de Aperfeiçoamento Profissional-
Regional de Araraquara-EAP

2008-2010 Pós-graduação em Periodontia –
Nível de Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara-
UNESP

Dedico mais esta vitória...

Á Deus

Por ter me garantido serenidade, paciência e perseverança, guiando-me por caminhos desafiadores, porém seguros, abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz, e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram a me levantar nos momentos onde a queda fez parte do aprendizado em minha jornada.

Aos meus pais

Que por meio de muita renúncia, compreensão, enorme incentivo e imenso amor compreenderam as minhas escolhas e tornaram possível esta conquista. Minha eterna gratidão. Se hoje eu consigo ser um pouco responsável, ter essa vontade enorme de crescer, buscar desafios e vencê-los, devo a vocês, que me guiam e incentivam, me apoiando em todos os meus sonhos. Ofereço a vocês todo meu amor, gratidão e admiração. Tenho orgulho de ser filha de vocês! Jamais existirão palavras que descreva tudo o que representam pra mim!

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

Ao meu irmão

Mesmo com a distância, você sempre estive presente em todas as conquistas de minha vida, torcendo e acima de tudo vibrando pela minha felicidade. Obrigada pela amizade, carinho, orações e apoio. Você é fundamental em minha jornada.

Agradecimentos especiais

À minha querida orientadora Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

Que transcendendo o papel de orientadora demonstrou que ensinar é mostrar que é possível. Aprender é tornar possível a si mesmo. Minha profunda admiração e gratidão à você, que soube ser professora, mestre, conselheira e acima de tudo amiga, guiando os meus passos e fornecendo-me a base para minha formação moral e científica. Serei eternamente grata por ter compreendido minhas limitações físicas, emocionais e intelectuais durante esse período.

Tenho grande admiração e carinho por você! Você que sempre acreditou no meu potencial e me permitiu e incentivou realizar o meu maior sonho de estágio no exterior, meu muito obrigada!

“Uma das coisas mais importantes da vida não é saber onde estamos, mas em que direção estamos indo.”

Oliver Wendell Holmes

Ao meu orientador no Canadá Daniel Grenier

Um exemplo de pesquisador, atencioso, que me recebeu de portas abertas e que me mostrou uma grande virtude: a humildade. Não tenho palavras para agradecer essa experiência inesquecível.

Ao meu Amor Rubinho

Por ter me compreendido e respeitado minha dedicação aos estudos, e acima de tudo me apoiando e estimulando a ir cada vez mais longe. Serei eternamente grata pelo seu carinho compreensão em todos os momentos difíceis sempre estando ao meu lado para me ouvir. Por ter respeitado os momentos que estava ausente para realização deste trabalho e pelo imenso amor depositado em nossa relação, que com certeza saberei retribuir.

"Amo a liberdade, por isso deixo livre tudo que tenho... Se voltar é porque conquistei, se não, é porque nunca possuí!"

Aos meus queridos amigos do coração: Priscila, Juliana G., Dani, Ju C., Thais, Mário, Nicole, Amanda, Chaine, Sâmia, Shelon, Andressa, Michele, Débora, Ju Rico, Ju Gondim, Raquel, Ju Pirola, Ana Lúcia, Rubão.

Aos que conheço a muitos anos e aos que nem faz tanto tempo assim, mas que já moram no meu coração, apesar da distância, agradeço por dividirem comigo momentos difíceis e outros tantos agradáveis. Aos que estão mais perto agradeço o convívio diário e principalmente os segredos compartilhados com tanta cumplicidade, carinho e confiança. Saudades de tudo vivido com cada um de vocês, amo em especial todos vocês.

"Todos ouvem o que você diz. Os amigos escutam o que você fala. Os melhores amigos prestam atenção ao que você não diz." Anônimo

Aos amigos Canadenses Jacynthe, Laettitia, Renato, Reginaldo, Juliana, Anthoany, Pierri, Dang, Shinichi, em especial ao Jabrane

Obrigada por terem feito do meu maior sonho a realidade mais perfeita e linda. Obrigada pelo acolhimento, amizade, carinho por todos os momentos convvidos. O tempo junto foi curto, mas as lembranças jamais se apagarão. São momentos que se eternizaram.

"A verdadeira amizade se assemelha a um cacto o qual pode ficar anos e anos sem receber uma gota de água, que jamais morrerá." Anônimo

Agradecimentos

Ao Prof.Dr. Carlos Rossa Junior, A ele devo onde estou hoje, por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório, me ensinado como é belo o caminho da pesquisa, por ter acredito no meu potencial e acima de tudo me encorajado e orientado ao caminho da Pós Graduação. Muito Obrigada por tudo!

Aos amigos e professores que colaboram de alguma forma com este trabalho
Profa. Dra. Adriana, Prof. Dr. Joni, Profa. Dra. Marcia Meyer, Nicole, Ju Gondim, Ju Pirola, Rubão, Guilherme, Rubinho, Sâmia.
Muito Obrigada pelos ensinamentos, colaboração e acima de tudo amizade por estar presente nesta vitória

A TODOS (sem distinção) companheiros de pós-graduação, por todos os momentos agradáveis e alegres, a presença de vocês, com certeza, colaborou para meu crescimento científico e intelectual.

Aos meus grandes amigos da turma 78, turma inesquecível, que levarei para o resto da vida por todos os momentos vividos juntos, sejam eles alegres ou tristes.

Ao coordenador do curso de Pós Graduação – Área de Periodontia Prof. Dr Joni Augusto Cirelli e a todos os Professores Dra. Rosemary Adriana C Marcantonio, Dr Elcio Marcantonio Junior, Dr. José Eduardo Cezar Sampaio, Dr. Carlos Rossa Junior, Dr. Joni Augusto Cirelli, Dra Silvana R P Orico, Dr. Benedito C de Toledo, Dr. Ricardo S G Abi Rached, Glória M Thompson, Luís Carlos Spolidorio pela excelente formação e competência.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP na pessoa do Ilmo diretor **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.**

A todos os funcionários dos Departamentos de Diagnóstico e Cirurgia, e Fisiologia e Patologia, pelo carinho paciência e amizade sempre disponível.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara e em especial aos funcionários da biblioteca e da seção de pós graduação.

Aos **pacientes**, por terem compreendido a importância de comparecer, e, não me abandonando, tornaram possível a realização deste estudo.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro concedido.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste trabalho

Epígrafe:

"Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter. O Espírito encarnado sofre constantes transformações por fora, a fim de acrisolar-se e engrandecer-se por dentro." (Chico Xavier)

Sumário

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
PROPOSIÇÃO.....	21
CAPÍTULO 1.....	22
CAPÍTULO 2.....	42
CAPÍTULO 3.....	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109
CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXO 1: Certificado de Aprovação pelo Comitê de ética em Pesquisa	120
ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	121
ANEXO 3: Material e Métodos.....	124

Bedran TBL. Efeito da terapia periodontal na microbiota subgengival. Parâmetros clínicos e microbiológicos comparativos de PCR semi quantitativo e PCR em tempo real [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Resumo

A correta distinção dos micro-organismos envolvidos na patogênese da doença periodontal torna-se importante para o entendimento da sua progressão, auxiliando no adequado planejamento do tratamento periodontal. Assim métodos moleculares tornam-se ferramentas de grande valia no diagnóstico microbiológico. A técnica do PCR convencional é um método já estabelecido na literatura, porém não permite uma quantificação exata das amostras avaliadas. Com isso o PCR em tempo real surgiu para complementar o PCR convencional. O objetivo do presente estudo foi realizar a análise comparativa de ambas as técnicas na detecção de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas endodontalis*. Foram selecionados 20 pacientes sistemicamente saudáveis, com doença periodontal crônica generalizada. Após o exame clínico periodontal completo, 30 amostras de sítios doentes não adjacentes (PS \geq 5 e 7 mm com sangramento a sondagem) e 30 amostras de sítios saudáveis não adjacentes (PS \leq 3 mm e ausência de sangramento a sondagem) foram coletados antes e 60 dias após a terapia periodontal básica de raspagem, alisamento radicular e instrução de higiene oral. O PCR convencional, PCR em tempo real e *primers* específicos para cada técnica foram utilizados para análise microbiológica. Para a análise comparativa entre as técnicas o PCR em tempo real foi dividido em 3 scores de acordo com a quantidade de DNA e o PCR convencional em 2 scores, presente e ausente. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad. Os resultados mostraram que o PCR em tempo real possui maior sensibilidade e especificidade na detecção dos micro-organismos *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*, os quais foram detectados em maiores proporções nos sítios doentes quando comparados aos sítios saudáveis. Após a terapia periodontal básica houve redução significativa das bactérias analisadas. Dessa forma, sugere-se que a

presença do *P. endodontalis* pode influenciar na progressão da doença periodontal, e possui correlação positiva com as demais bactérias. O tratamento periodontal básico mostrou-se eficiente para a redução deste patógeno e o PCR em tempo real mostrou ser uma ferramenta eficaz na detecção e quantificação de periodontopatógenos.

Palavras-chaves: Reação em cadeia da polimerase, *porphyromonas gingivalis*, *porphyromonas endodontalis*, periodontite crônica, *tannerella forsythia*.

Bedran TBL. Efeito da terapia periodontal na microbiota subgengival. Parâmetros clínicos e microbiológicos comparativos de PCR semi quantitativo e PCR em tempo real [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Abstract

The correct distinguishment of microorganisms involved in the periodontal disease pathogen, it is important in the understanding of its progression and adequate treatment planning, in this way, different microbiologic diagnostic molecular methods became key instruments. The conventional PCR technique is a well established method, however does not permit a precise quantification of the evaluated samples, being complemented by the real time PCR. The aim of the present study was to realize a comparative analysis of both techniques in the detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas endodontalis*. 20 systemically healthy patients, with established generalized cronic periodontal disease were selected. After a complete clinical periodontal exam, 30 non adjacent affected sites samples (Depth Probing ≥ 5 e 7 mm with positive bleeding) and 30 non adjacent healthy sites samples (depth probing ≤ 3 mm with negative bleeding) were collected initially and 60 days after a basic periodontal therapy, root scaling and oral hygiene instructions. Conventional PCR, real time PCR and specific primers for it technique were used for microbiological analysis. To permit a comparative analysis between both PCR methods studied, the real time PCR was divided in 3 different scores, in accordance to DNA quantity and the conventional PCR in 2 scores, present or absent. The GraphPad software was used to make the statistical analysis. The results demonstrated that the real time PCR are more sensitive and specific in the detection of *P. endodontalis*, *P. gingivalis* and *T. forsythia*, detecting them in a higher proportion in the affected sites when compared to the healthy sites. After the basic periodontal therapy, there was a significant reduction of the bacteria analyzed. That way, can be suggested that presence of *P. endodontalis* can have an influence in the disease progression and have a positive relation with the other group of studied bacteria. The real time

PCR is an efficient method in the detection and quantification of specific pathogens.

Keywords: Polymerase Chain Reaction, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, Periodontal disease, *Tannerella forsythia*.

Introdução

A periodontite é uma doença infecciosa de patogênese complexa que se caracteriza clinicamente pela destruição dos tecidos de suporte do dente, podendo evoluir até a perda do dente e que possui como fator etiológico o biofilme dental. Mesmo em condições clínicas de saúde, os tecidos periodontais estão em confronto contínuo com micro-organismos potencialmente patogênicos, e até certo ponto, convivem eficazmente com estas agressões^{8,16-17,35,38,46,54}.

A relação entre doença periodontal e biofilme dental já está bem estabelecida e a literatura relata a ocorrência de mais de 700 espécies bacterianas no ambiente bucal, sendo que 415 espécies presentes no biofilme dental subgingival são encontradas em diferentes casos clínicos de periodontite^{1,18,40}.

Algumas das espécies do biofilme bacteriano associadas à doença periodontal destrutiva incluem *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*¹⁹. Entretanto outras espécies vem sendo descritas na literatura e poderiam estar correlacionadas e/ou associadas com o início e evolução da doença periodontal^{1,11,40}.

Alguns trabalhos avaliaram a presença de grande número de novas bactérias presentes na cavidade bucal, mostrando que novos patógenos periodontais necessitam ser identificados e podem ter papel importante na progressão da doença periodontal^{12,24}. Dentre eles, merece destaque o patógeno *Porphyromonas endodontalis*, inicialmente pesquisado em infecções originárias da polpa, mas que também pode ser isolado de bolsas periodontais e outros sítios da cavidade bucal. Assim, observa-se a necessidade de estudos mais aprofundados para determinar sua prevalência e papel na doença periodontal^{22,38}.

O *Porphyromonas endodontalis* é um micro-organismo Gram-negativo anaeróbico restrito, porém seu mecanismo de patogenicidade não é muito bem conhecido. Estudos de Dahlén, Leonhardt¹¹ (2006) sugerem que *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella tannerae* e *Filifactor alocis* poderiam estar

significativamente associadas com a doença periodontal por encontrarem-se em maiores concentrações em sítios doentes quando comparados à sítios saudáveis. Adicionado a isso, concluíram que essas três bactérias poderiam associar-se às doze bactérias rotineiramente diagnosticadas em pacientes com doença periodontal crônica, já descritas na literatura¹¹.

A forma como os diferentes tipos de terapias periodontais interferem na população bacteriana subgingival, que é altamente complexa e difere significativamente de sítios periodontais profundos e sítios periodontais saudáveis, ainda não está completamente definida^{6,11,14}. Somente a avaliação clínica como parâmetro de sucesso para a aplicação de tratamento específico da doença periodontal, ignorando as alterações na proporção da microbiota subgingival decorrente destas terapias, muitas vezes leva a resultados clínicos desfavoráveis. Apesar dos efeitos clínicos da Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) estarem bem definidos, o diagnóstico microbiológico da doença periodontal torna-se uma ferramenta de grande valor em casos de doenças periodontais refratárias ou que não respondem bem ao tratamento periodontal básico, ajudando em um melhor prognóstico e diagnóstico da doença¹⁴.

Os primeiros estudos utilizando diagnóstico microbiológico em periodontia surgiram na década de 80 e avaliaram o efeito da RAR na microbiota subgingival através de microscopia de campo escuro, relatando reduções significativas no percentual de bastonetes móveis e espiroquetas, bem como o aumento concomitante no percentual de cocos e bastonetes não móveis^{6,26-27}. Técnicas de cultura microbiana, considerada o padrão ouro para diagnóstico, também foram utilizadas em estudos que observaram diminuição de micro-organismos após terapia periodontal de RAR^{6,42}.

A técnica de cultura é o método de diagnóstico microbiológico capaz de identificar novas espécies bacterianas e determinar a susceptibilidade desses micro-organismos frente aos antimicrobianos²⁵. Apesar de bastante valiosa, técnicas baseadas em cultura de bactérias possuem algumas limitações, como a necessidade de preservar a viabilidade bacteriana, na identificação de espécies devido a alta seletividade de micro-organismos, rigorosas condições de transporte

das amostras, necessidade de preparo de meios específicos para cada espécie de micro-organismo, além do elevado tempo de cultivo para algumas espécies, ou mesmo, impossibilidade de cultivo, espaço físico considerável para análise de grandes números de espécies^{25,38,41}.

Os avanços ocorridos na ciência e tecnologia expandiram muito os conhecimentos sobre a patogênese das doenças bucais, em particular das doenças periodontais. O conhecimento sobre a etiopatogênese de várias doenças avançaram de forma rápida, e conseqüentemente os diagnósticos ganharam notáveis reforços fundamentados nessas técnicas, permitindo traçar melhores protocolos de tratamentos para as mais variadas patologias^{6, 19-20, 45, 53}.

Técnicas de biologia molecular têm sido ferramentas de grande valia para pesquisadores no intuito de detectar espécies de difícil cultivo ou não cultiváveis e servirem de apoio na etiologia das pesquisas e tratamentos clínicos para a seleção do tratamento periodontal básico e complementar. Porém um adequado diagnóstico microbiológico depende da técnica empregada¹⁹, pois bactérias da microbiota subgengival necessitam de condições de anaerobiose para seu crescimento. Assim, problemas durante o diagnóstico desses patógenos com o cultivo e transporte das amostras tem sido levado em consideração^{20, 53}.

O interesse em melhorar o entendimento sobre a patogênese, epidemiologia, genética e evolução das infecções causadas por periodontopatógenos tem conduzido ao desenvolvimento de técnicas e pesquisas, empregando métodos alternativos de diagnósticos, como por exemplo, métodos enzimáticos, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Métodos de PCR são específicos, sensíveis e consistem basicamente na amplificação gênica sequencial de fragmentos de DNA pré-determinados e específicos de um determinado micro-organismo²⁰. Este método detecta o produto na fase de platô da reação, ou seja, no término da mesma e não é possível realizar uma quantificação precisa do número de bactérias.

Para verificar maior prevalência de periodontopatógenos em pacientes com periodontite avançada e gengivite no adulto e gengivite em criança comparativamente, Ashimoto et al.⁵ (1996) avaliaram através da técnica do PCR

convencional (semi quantitativo) a presença de 8 patógenos putativos (*A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. denticola*) concluindo forte associação entre as espécies e os casos de periodontite⁵. Da mesma maneira, Mineoka et al. (2008)³⁴ detectaram por PCR a presença de 3 patógenos (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) em amostras de fluido subgengival de sítios saudáveis e doentes resultando em maior prevalência desses periodontopatógenos na doença periodontal comparados com os sítios saudáveis.

Klein, Gonçalves²¹ (2003) determinaram a prevalência de *T. forsythia* e *P. gingivalis* em amostras de placa subgengival por PCR e observaram a associação entre a doença periodontal e maior prevalência de *T. forsythia* e *Porphyromonas gingivalis*.

Utilizando a mesma técnica de PCR convencional, Malheiros, Avila-Campos³¹ (2004) avaliaram a presença dos patógenos *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* em sítios periodontais e sítios saudáveis, concluindo que o PCR detecta periodontopatógenos em amostras de fluido subgengival, oferecendo uma ferramenta auxiliar, de diagnóstico rápido e seguro das doenças periodontais³¹.

Grande atenção tem sido dada ao desenvolvimento e aplicação de técnicas específicas, com o objetivo de contribuir na identificação e caracterização desses periodontopatógenos e no conhecimento sobre essas interações microbianas e a relação com os fatores clínicos. Dessa forma, alguns esforços têm sido feitos para quantificar o DNA alvo das moléculas e servir como padrão para as reações de PCR. Porém o PCR padrão é deficiente na determinação da quantificação precisa do DNA, e somente ao final da reação ele pode ser analisado^{9,20}. Portanto, muitas vezes são obtidos resultados falso positivo ou falso negativo, devido a não quantificação exata de cada micro-organismo. A fim de superar esse problema, foi desenvolvido o método de PCR em tempo real (qPCR), o qual monitora diretamente o aumento do produto de PCR através das amostras enzimáticas, permitindo a detecção e quantificação de pequeno número de patógenos, consumindo menor tempo de trabalho para obtenção dos resultados^{8,24}.

O PCR em tempo real utiliza o sistema *Taq Man* ou *Sybr Green* para medir o acúmulo dos produtos de PCR com amostras fluorescentes e em tempo real rastreia com o uso de laser os produtos finais. A detecção através do método *Sybr Green*, possui custo mais baixo que o sistema *Taq Man*, e também mais flexível pois não necessita da confecção de sondas específicas para determinado *primer*, porém é menos específica por ser ligar em qualquer DNA dupla fita.

A quantidade das moléculas dos produtos de PCR sintetizados depende diretamente da quantidade de moléculas padrão. Os dados para a quantificação são coletados na fase exponencial do PCR, permitindo quantificação precisa do número de cópias do DNA alvo quando usados padrões internos e externos. O PCR em tempo real tem sido usado para identificar vários periodontopatógenos dentre eles *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola* e vírus^{13,20,36}.

Nonnemacher et al.³⁷ (2004) observaram que o PCR em tempo real permite detectar e quantificar o DNA de periodontopatógenos com mais especificidade das amostras de placa subgingival. Essa quantificação das bactérias ajuda esclarecer o papel dos diferentes tipos de micro-organismos e possibilita o entendimento da etiologia complexa das doenças periodontais^{10,33,37,49}.

Para identificar espécies bacterianas periodontais, Verner et al.⁵² (2006) demonstraram que o PCR em tempo real mostrou ser bastante sensível na detecção e quantificação de periodontopatógenos presentes na doença periodontal^{28-29,47,52}. Da mesma maneira, Tsarev et al.⁵⁰ (2006) detectam a presença de bactérias Gram negativas (*T. forsythia*, *T. denticola* e *P. gingivalis*) e *Candida albicans* em pacientes com doença periodontal crônica.

Assim, o PCR em tempo real apresentou-se como uma ferramenta eficaz para detecção de patógenos presentes em doenças da cavidade bucal. Relatos semelhantes foram obtidos por Boutaga et al.⁸ (2007) que observaram que o PCR em tempo real dispensa tempo e trabalho do operador, sendo também específica e sensível na detecção e quantificação dos periodontopatógenos. Numa visão mais

abrangente, o PCR em tempo real podem dar novas percepções do papel da patogênese periodontal e de bactérias periodontais não cultiváveis^{4,8,48}.

Assim, a quantificação precisa na detecção dos periodontopatógenos e outras espécies de micro-organismos poderiam facilitar o monitoramento da terapia periodontal e permitir um correto estudo epidemiológico da progressão da doença, pois muitas vezes através da técnica de PCR semi quantitativo obtem-se resultados falso negativo e este poderia ser melhorado utilizando a técnica de PCR em tempo real³⁶.

Proposição

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo prospectivo foi avaliar o efeito da terapia periodontal básica na diminuição dos micro-organismos presentes na periodontite crônica, através de análise clínica e microbiológica.

Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência do patógeno *Porphyromonas endodontalis* (*P. endodontalis* - *PE*) em bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica e a detecção dos demais micro-organismos presentes na doença periodontal.
- Analisar comparativamente a técnica de PCR convencional e PCR em tempo real na detecção dos patógenos *Tannerella forsythia* (*T. forsythia-Tf*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*--*Pg*) e *Porphyromonas endodontalis* (*P. endodontalis-Pe*) presentes no fluido crevicular de pacientes com periodontite crônica.

Capítulo 1: Análise comparativa entre cultura bacteriana e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real na detecção de periodontopatógenos: Revisão da Literatura.

Artigo submetido para publicação na Revista da Unesp.(2010)

TÍTULO: Análise comparativa entre cultura bacteriana e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) na detecção de periodontopatógenos: Revisão da Literatura.

TÍTULO: Comparative Analysis between culture and real time Polymerase Chain Reaction (qPCR) in microorganisms detection: Literature Review.

AUTORES:

Telma Blanca Lombardo BEDRAN¹, Marianne Nicole Marques NOGUEIRA¹,
Luis Carlos SPOLIDORIO², Denise Madalena Palomari SPOLIDORIO²

1- UNESP – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903.

2- UNESP – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Fisiologia e Patologia, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, 14801-903.

Trabalho baseado em dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Odontologia área de concentração em Periodontia da Faculdade de Odontologia UNESP – Araraquara.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Telma Blanca Lombardo BEDRAN

R. Expedicionários do Brasil, 2030 apt 32 Centro Araraquara-SP 14801-000

telmabedran@hotmail.com

Resumo: A correta distinção dos micro-organismos envolvidos na patogênese da doença periodontal, torna-se importante para o entendimento da sua progressão e adequado plano de tratamento. Métodos de identificação e quantificação foram desenvolvidos e são considerados extremamente sensíveis e precisos na caracterização das espécies bacterianas. Com isso a presente revisão de literatura mostra trabalhos existentes na literatura, os quais analisaram comparativamente os métodos de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) e cultura bacteriana com objetivo na identificação de periodontopatógenos. Através do método de cultura bacteriana é possível a identificação de novos micro-organismos e realização de testes de sensibilidade a antibióticos. O qPCR é um teste microbiológico que identifica e quantifica espécies bacterianas, através da amplificação gênica de fragmentos de DNA pré-determinados, com alta sensibilidade, especificidade e dispendem menor tempo do operador quando comparados a cultura bacteriana. Assim para a escolha de um determinado teste diagnóstico deve-se levar em consideração não somente a sua precisão na identificação dos micro-organismos, mas também a relação custo-benefício.

Palavras chaves: Meios de cultura, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Periodontite.

Abstract: The correct distinguishment of microorganisms involved in the periodontal disease pathogen, it is important in the understanding of its progression and adequate treatment planning. Considering this fact, some molecular methods of identification and quantification were developed and are extremely sensitive and precise in the characterization of different bacteria species. The present study aimed to realize a literature review, including studies that realized a comparative analysis between bacterial culture and real time PCR methods in the identification of pathogens. The bacterial culture method can possibly identify new microorganisms and realize antibiotics sensitivity tests. The real time PCR is a microbiologic test that identifies and quantifies bacterial species, through gene amplification of predetermined DNA fragments, with high sensitivity and specificity, and need a shorter operation time of the operator when compared to the bacterial culture method. In this way, to determine a specific diagnostic test, should be considered not only its precision in the identification of microorganisms, but the cost-benefit relationship as well.

Keywords: Culture Media, Polymerase Chain Reaction (PCR), Periodontitis.

Introdução

A periodontite é uma doença infecciosa crônica que se caracteriza clinicamente pela destruição dos tecidos de suporte periodontais, podendo evoluir até a perda do elemento dentário, e possui como fator etiológico o biofilme dentário, constituído por micro-organismos aeróbios e anaeróbios facultativos Gram negativos^{1,2}. As principais espécies bucais envolvidas nesta doença incluem: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*^{3,4,5,6}.

A raspagem e alisamento radicular com ou sem complementação cirúrgica é o tratamento recomendado para a periodontite, juntamente com a instrução de higiene oral. Entretanto, existem casos de periodontite agressiva ou refratária, os quais podem não responder ao tratamento periodontal tradicional¹. Na prática clínica não é difícil de se deparar com tal situação e o profissional questiona-se sobre qual a melhor conduta a ser adotada e como explicar para o paciente, cada vez mais informado a respeito da resistência aos antibióticos, sobre a complexidade da doença apresentada e conseqüentemente o motivo do tratamento complementar com antibióticos. Neste momento é importante que o clínico tenha conhecimento dos periodontopatógenos presente no biofilme subgingival para uma administração efetiva das terapias antimicrobianas¹.

Grande atenção tem sido dada ao desenvolvimento e aplicação de técnicas específicas, com o objetivo de contribuir na identificação e caracterização de periodontopatógenos, no conhecimento sobre as interações microbianas e a

relação com os fatores clínicos da doença periodontal^{2,7,8}. Uma dessas técnicas é a cultura microbiana, um método clássico em microbiologia. Entretanto, técnicas mais modernas de biologia molecular como a reação da cadeia da polimerase em cadeia (PCR) e a reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) tem sido desenvolvidas para tal finalidade.

Apesar das técnicas de biologia molecular serem apropriadas para detecção dos micro-organismos, esta parece ser uma linha distante da prática odontológica. Dessa maneira, é importante para esse profissional estar familiarizado com os avanços ocorridos na ciência e tecnologia, já que os instrumentos de pesquisas expandiram diversos conhecimentos sobre a patogênese das doenças periodontais e está constantemente surpreendendo a comunidade científica, devido à quantidade de técnicas que vem surgindo na literatura. Frente a tais considerações, este trabalho teve como objetivo comparar a precisão do teste diagnóstico de qPCR com o padrão ouro de cultura bacteriana na detecção dos principais patógenos periodontais.

Revisão da Literatura e Discussão

Os artigos para essa revisão foram baseados na semelhança da amostra, ou seja, os pacientes possuíam periodontite não tratada, não haviam recebido tratamento periodontal ou antibioticoterapia nos últimos 3 a 6 meses, coletas de amostra subgingival foram obtidas do sítio mais profundo em cada quadrante da dentição com pontas de papel absorvente estéril para detecção e quantificação de patógenos periodontais. No entanto, para os métodos de extração de DNA devido

às diferentes técnicas observadas nos trabalhos selecionados foi o ponto em que não foi possível agrupar trabalhos semelhantes.

Com o progresso alcançado pelas ciências biológicas e impulsionado pelo desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular, observou-se um grande e importante desenvolvimento nas mais diversas áreas de conhecimento, como, medicina, medicina veterinária, ciências farmacêuticas, odontologia entre outros. Entretanto, enquanto as bases científicas proporcionadas pelas técnicas clássicas tiveram poucos acréscimos, os conhecimentos moleculares avançaram e continuam avançando rapidamente proporcionando de forma incontestável uma evolução na dinâmica da ciência e conseqüentemente nos benefícios das pesquisas científicas.

Os métodos de avaliação laboratorial da microbiota bacteriana bucal foram e continuam sendo desenvolvidos e incluem: microscopia de campo escuro, cultura bacteriana, análise enzimática, imuno-ensaios, sondas de DNA e reação da polimerase em cadeia (PCR) ¹.

Na Odontologia, a cultura bacteriana é um método clássico de diagnóstico de periodontopatógenos residentes no biofilme subgengival. Este é um método capaz de identificar novas espécies, de oferecer mensuração quantitativa das espécies viáveis e de realizar teste de resistência antibiótica. O resultado disto é que a cultura bacteriana é considerada o padrão ouro no diagnóstico microbiológico periodontal e continua sendo um importante meio de diagnóstico de diversas doenças ¹.

Esta técnica é capaz de quantificar e identificar a presença ou ausência de determinado micro-organismo. Dessa forma, ao permitir a quantificação de bactérias, a cultura bacteriana proporciona comparação com a condição clínica no estado de saúde e doença, bem como é capaz de determinar a proporção de cada micro-organismo em diferentes fases do tratamento, e com isso esclarecer o potencial papel dos mesmos na etiologia complexa da doença periodontal ⁹.

Apesar de apresentar-se como importante método diagnóstico, a cultura possui várias limitações e exigências, como a necessidade de preservar a viabilidade bacteriana, a dificuldade de recuperar espécies cultiváveis quando estas são encontradas em número reduzido, incapacidade de detectar micro-organismos em baixas proporções, necessidade de pessoal capacitado, tempo e custo relativamente altos, intensificação do trabalho, rigorosas condições de transporte das amostras e a necessidade de preparo de meios específicos para cada espécie ^{3,10,11}.

Além das limitações citadas anteriormente, espécies importantes relacionadas à doença periodontal, como por exemplo, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, exigem condições rigorosas para seu crescimento e são difíceis de serem detectadas e quantificadas através de métodos convencionais de cultura bacteriana ^{12,13}.

Com o advento de técnicas de Biologia Molecular os conhecimentos sobre a etiopatogênese de várias doenças, avançaram de forma rápida, e consequentemente os diagnósticos ganharam notáveis reforços fundamentados

nessas técnicas, permitindo traçar melhores protocolos de tratamentos para as mais variadas patologias ^{14, 15}.

Técnicas de biologia molecular têm sido ferramentas de grande valia para pesquisadores no intuito de detectar espécies de difícil cultivo ou não cultiváveis e servem de apoio na etiologia das pesquisas e tratamentos clínicos para a seleção do tratamento periodontal básico e complementar adequado ^{14, 16}.

Dois principais métodos de PCR foram descritos: técnica de PCR ¹⁵ (PCR convencional ou PCR qualitativo) e a qPCR (PCR em tempo real ou PCR quantitativo) ¹⁷. O PCR detecta espécies viáveis e não viáveis, possui boa especificidade o que lhe permite distinguir patógenos alvos de numerosas espécies muito próximas presentes na cavidade bucal, o que não é possível pela técnica de cultura bacteriana ¹⁸. Entretanto a técnica de PCR somente detecta os microorganismos na fase de platô da reação e é incapaz de realizar uma quantificação precisa do número de bactérias ^{19,20,8,21,22}.

O PCR consiste basicamente na amplificação gênica sequencial de fragmentos de DNA pré-determinados e específicos de determinada espécie. Esta técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores – “*primers*”, que delimitam a sequência de DNA de dupla fita alvo da amplificação. Estes “*primers*” são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo. Uma vez

amplificado esta sequência de nucleotídeos poderá ser facilmente detectada por uma simples eletroforese em gel de agarose. Esta técnica oferece um tempo de detecção rápido e uma maior precisão quando comparados com culturas bacterianas ¹⁴.

A técnica de qPCR monitora diretamente o aumento do produto de PCR através das amostras enzimáticas permitindo a detecção de um número muito pequeno de patógenos ²³. O qPCR utiliza o sistema *Taq Man* ou *Sybr Green* para medir o acúmulo dos produtos de PCR com amostras fluorescentes e em tempo real rastreia com o uso de laser os produtos finais. O sistema *Taq Man* utiliza sonda fluorescente para permitir a detecção de determinado produto de PCR, uma vez que se acumula durante a amplificação da reação, ou seja, ela é específica para um determinado genótipo bacteriano. O sistema *Sybr Green* utiliza corantes que se intercalam com qualquer dupla fita de DNA, ou seja, não é específico para um determinado patógeno, porém possui custo mais baixo que o sistema *TaqMan* ^{19,8,21,22}.

A quantidade de moléculas dos produtos de qPCR sintetizados depende diretamente da quantidade de moléculas padrão. Os dados para a quantificação são coletados na fase exponencial do qPCR, permitindo quantificação precisa do número de cópias do DNA alvo quando usados padrões internos e externos.

O qPCR tem sido usado para identificar alguns dos principais patógenos periodontais como: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *T. forsythia* e alguns vírus ^{14,24}. Shelburne et al. ²⁵ (2000) utilizaram o método do qPCR através do sistema *TaqMan* para detectar e quantificar *T. forsythia* em

amostras de biofilme subgingival, concluindo que esta técnica é um método indicado no diagnóstico microbiológico²⁵. Morillo et al.²⁴ (2003) utilizando a mesma técnica, mas com o sistema *Sybr Green* na detecção e quantificação de espécies bacterianas de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* em amostras de biofilme subgingival, encontraram boa sensibilidade e especificidade na detecção de ambas as bactérias, obtendo melhores resultados na detecção do *A. actinomycetemcomitans*.

Este método de biologia molecular é atraente devido a sua facilidade de utilização, tempo de resposta rápida, bem como o potencial para ser totalmente automatizado. Pode multiplicar excessivamente pequena quantidade de DNA bacteriano e podem detectar baixas quantidades de bactérias. Embora estes testes forneçam informações úteis, o método de detecção bacteriana que pode determinar se bactérias são sensíveis a um antibiótico específico é o teste laboratorial de cultura bacteriana²⁶.

Segundo Eick, Pfister²⁷ (2002) demonstrando as vantagens das sondas de DNA, sugeriram que técnicas de PCR deverão substituir práticas de cultura bacteriana tidas como padrão ouro no diagnóstico dos periodontopatógenos. Além disso, o qPCR não só proporciona uma detecção rápida, mas também quantifica bactérias presentes em determinados sítios. Entretanto, as técnicas de biologia molecular permitem somente a identificação de bactérias para o teste a qual é concebido. Nenhuma informação adicional pode ser adquirida, como por exemplo, a detecção de bactérias inesperadas, testes de suscetibilidade antibiótica, os quais podem ser realizados por técnicas de cultura bacteriana. Dessa forma,

ficou demonstrado que a técnica de qPCR é um método sensível e específico para a identificação de periodontopatógenos.

Boutaga et al.²⁸ (2003) realizaram análise comparativa entre as técnicas de cultura bacteriana e qPCR na detecção de *P. gingivalis*. Observou-se maior detecção de *P. gingivalis* por qPCR quando comparados a cultura, devido ao fato do qPCR detectar espécies viáveis e também não viáveis. O qPCR mostrou ser uma técnica rápida e sensível na detecção de micro-organismos presentes nos sítios periodontais.

Em estudo semelhante, Lau Sans et al.¹¹ (2004) compararam as técnicas de cultura e qPCR na detecção de 3 principais patógenos relacionados com a doença periodontal, demonstrando que a técnica de qPCR é capaz de identificar e quantificar os patógenos, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia* com alto grau de sensibilidade e especificidade quando comparados com o padrão ouro de cultura bacteriana. Este fato poderia ser explicado devido a mínima quantidade de patógenos necessários para serem detectados por cultura e pelas severas condições de crescimento e cultivo exigidas por esta técnica. Ainda nos estudos de Lau Sans et al.¹¹ (2004), a cultura bacteriana mostrou alta sensibilidade, especificidade e valor preditivo na detecção de *P. gingivalis*. Entretanto na detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia* sua sensibilidade e valor preditivo foram menores quando comparados ao qPCR. Este fato pode ser explicado pelos diferentes limites de detecção de patógenos, sendo 10 para qPCR e 10^2 - 10^4 para cultura bacteriana, o que resulta em maior sensibilidade demonstrada pelo qPCR. As diferenças entre os patógenos

analisados poderia ser explicado devido as condições específicas de crescimento o que limitaria a recuperação de micro-organismos de difícil cultivo no método de cultura ¹¹.

Em geral as diferenças entre cultura bacteriana e qPCR podem dar novas percepções do papel da patogênese periodontal e de bactérias periodontais não cultiváveis. Boutaga et al. ²⁹ (2005) e Jervoe et al. ¹⁴ (2005) compararam as técnicas de cultura bacteriana e qPCR para detecção de periodontopatógenos concluindo que o uso de qPCR dispensa trabalho e tempo do operador, sendo também específico e sensível na detecção e quantificação de 5 periodontopatógenos testados (*P. intermedia*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium spp.*).

Para esclarecer o papel dos diferentes tipos de micro-organismos e possibilitar o entendimento da etiologia complexa das doenças periodontais, o estudo comparativo de Nonnemacher et al. ²⁶ (2005) entre cultura bacteriana e qPCR permitiram detectar e quantificar periodontopatógenos com mais especificidade das amostras de biofilme subgingival utilizando-se a técnica de qPCR ²⁶.

Determinadas espécies de periodontopatógenos como *P. intermedia* e *Prevotella nigrescens* são de difícil diferenciação quando se utiliza testes fenotípicos como rotina. Segundo Tanner et al. ¹³ (1986) e Kuboniwa et al. ²⁰ (2004) a diferenciação entre eles pode ser inequívoca através do perfil de DNA e cultura. Entretanto com a utilização da técnica de qPCR não ocorre resultados falso positivos, devido a maior sensibilidade da técnica. Outra espécie de difícil

detecção através do método clássico de cultura bacteriana é a bactéria *T. denticola*. Este micro-organismo não forma colônias e possui altas exigências de crescimento levando a resultados falsos negativos através do método de cultura.

Verner et al.³⁰ (2006) realizaram análise comparativa entre qPCR e cultura bacteriana e observaram maior sensibilidade e especificidade para o qPCR em particular na detecção de *T. denticola*, sendo identificado em mais de 80% das amostras isoladas de doença periodontal. Para *P. intermedia* e *P. nigrescens* os meios utilizados através da cultura não conseguiram distinguir entre as duas espécies, levando a uma superestimação da quantidade real de *P. intermedia*. Entretanto, utilizando-se o qPCR foi possível diferenciar as duas espécies de micro-organismo.

Analisando comparativamente cultura bacteriana e qPCR, para periodontopatógenos (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *Micromonas micros* e *Fusobacterium* spp.) em sítios saudáveis e sítios com doença periodontal, Boutaga et al.³¹ (2006) e Mineoka et al.³² (2008) concluíram que ambas as técnicas foram eficientes para detectar os micro-organismos em maior quantidade nos sítios doentes comparados aos controles saudáveis. O qPCR mostrou alta sensibilidade e especificidade em comparação com a técnica de cultura bacteriana com exceção na detecção do *A. actinomycetemcomitans*. Este fato se deve a alta sensibilidade do qPCR e a baixa quantidade deste micro-organismo presente na doença.

Portanto uma precisa quantificação na detecção dos periodontopatógenos poderia facilitar o monitoramento da terapia periodontal e permitir um correto estudo epidemiológico da progressão da doença periodontal ²⁹.

O qPCR é um método diagnóstico microbiológico promissor para a detecção e quantificação de periodontopatógenos, com a vantagem de ser rápido, preciso, sensível, e quantitativo na detecção de pequenas quantidades de patógenos bucais, que não estão sob o limite de detecção da cultura bacteriana ¹.

Conclusões

A técnica de qPCR apresenta maior especificidade, sensibilidade na detecção de periodontopatógenos quando comparada à técnica de cultura bacteriana. A escolha do teste microbiológico para avaliação clínica de indivíduos com doença periodontal deve ser levada em consideração com outros fatores, incluindo precisão diagnóstica, custo e disponibilidade. Além disso, estudos clínicos controlados ainda são necessários para avaliar criteriosamente a técnica de qPCR no tratamento ou acompanhamento dos pacientes com doença periodontal.

Referências Bibliográficas

1. Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter*

- actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis: a meta-analysis. *J Periodontol.* 2008; 79:1620-9.
2. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J. Clin Periodontol.* 2004; 31: 1034-47.
 3. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:5721-32.
 4. Armitage GC. Periodontal diseases: Diagnosis *Ann Periodontol.* 1996; 1: 37-215.
 5. Feres M, Gonçalves C. O impacto do diagnóstico microbiológico na terapêutica periodontal. Opperman R.C., Rosing C.K. *Periodontia ciência e clinica.* São Paulo: Artes médicas, 2001; 2: 39-56.
 6. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1994; 5: 78–111.
 7. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996;11: 266-73.
 8. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, Van Poperin N, Hujoel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic

bacteria: can culture be considered the primary reference standard? J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 418-426.

9. Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. J Periodontol. 2005; 76: 1542-9.
10. Lamster IB, Celenti RS, Jans HH, Fine JB, Grbic JT. Current status of tests for periodontal disease. Adv Dent Res. 1993; 7: 182-90.
11. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol. 2004; 31: 1061-9.
12. Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontal Res. 2003; 38: 465-70.
13. Tanner AC, Goodson JM. Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. Oral Microbiol Immunol. 1986; 1: 15-22.
14. Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol. 2005; 32: 778-83.

15. Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I & Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52, 841–849.
16. Jervøe-Storm PM, Alahdab H, Koltzsch M, Fimmers R, Jepsen S. Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as analyzed by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2007; 78: 909-17.
17. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technol.* 1992; 10: 413–17.
18. Poulsen K, Ennibi OK, Haubek D. Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4829–32.
19. Klein MI, Gonçalves RB. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. *J Periodontol.* 2003; 74:798-802.
20. Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immuno.* 2004;19: 168-76.

21. Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for Porphyromonas gingivalis and total bacteria. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2362-2365.
22. Watanabe K, Frommel TO. Detection of Porphyromonas gingivalis in oral plaque samples by use of polymerase chain reaction. J Dent Res. 1993; 72: 1040-44.
23. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. J Periodontol. 2007; 78: 79-86.
24. Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D & Silva, A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. J Periodont Res. 2003; 38: 518-24.
25. Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA. Quantitation of Bacteroides forsythus in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. J Microbiol Methods. 2000; 39: 97-107.
26. Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. J Microbiol Meth. 2004; 59: 117-25.
27. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic

- species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 638-44.
28. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Comparison of Real-Time PCR and Culture for Detection of *Porphyromonas gingivalis* in Subgingival Plaque Samples *J clinical microbiol.* 2003; 41: 4950-54.
29. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *Immunol Med Microbiol.* 2005; 45: 191-9.
30. Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 2: 341-6.
31. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 427–33.
32. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site-Specific Development of Periodontal Disease Is Associated With Increased Levels of *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in Subgingival Plaque. *J Periodontol.* 2008;79: 670-76.

Capítulo 2: Análise comparativa da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) semi quantitativo e PCR em tempo real, na detecção de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas endodontalis* em amostras de fluido subgengival

Artigo a ser submetido para publicação

Análise comparativa da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) semi quantitativo e PCR em tempo real (qPCR), na detecção de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas endodontalis* em amostras de fluido subgengival

Resumo:

Métodos moleculares são ferramentas de grande valia no diagnóstico microbiológico. A técnica do PCR convencional é um método já estabelecido na literatura de diagnóstico, porém não permite quantificação exata das amostras avaliadas. Com isso o PCR em tempo real surgiu para complementar o PCR convencional. O objetivo do presente estudo foi realizar análise comparativa de ambas as técnicas na detecção de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas endodontalis*. Foram selecionados 20 pacientes sistemicamente saudáveis, com doença periodontal crônica generalizada. Após o exame clínico periodontal completo, 30 amostras de sítios doentes não adjacentes ($PS \geq 5$ e 7 mm com sangramento a sondagem) e 30 amostras de sítios saudáveis não adjacentes ($PS \leq 3$ mm e ausência de sangramento a sondagem) foram coletados antes e 60 dias após a terapia periodontal básica de raspagem, alisamento radicular e instrução de higiene oral. PCR convencional, PCR em tempo real e *primers* específicos para cada técnica foram utilizados para análise microbiológica. Para a análise comparativa entre as técnicas o PCR em tempo real foi dividido em 3 scores de acordo com a quantidade de DNA e o PCR convencional em 2 score, presente e ausente. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad. Os resultados mostraram que para as três bactérias analisadas, o PCR em tempo real mostrou maior sensibilidade e especificidade na detecção dos micro-organismos. A concordância entre as técnicas foi moderada, concluindo ser o PCR em tempo real uma ferramenta de grande valia na detecção e quantificação de periodontopatógenos.

Palavras-chaves: Reação em cadeia da polimerase, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythia*, Periodontite crônica.

Comparative analysis between Polymerase Chain Reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) in the detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas endodontalis* presented in subgingival plaque sample.

Abstract: Molecular methods can be consider an essential tool in microbiological diagnostic. The conventional PCR technique is a well established method of analysis in the literature; however it does not permit an exact quantification of the evaluated samples. Aiming to complement the lack in the quantification of the conventional PCR technique, many researchers use the real time PCR technique method, due to its capability in quantify the samples in analysis. The objective of the present study was to realize a comparative analysis of both PCR techniques methods in the detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Tanerella forsythia* and *Porhyromonas endodontali*. 20 systemically healthy patients, with established generalized cronic periodontal disease were selected. After a complete clinical periodontal exam, 30 non adjacent affected sites samples (Depth Probing ≥ 5 e 7 mm with positive bleeding) and 30 non adjacent healthy sites samples (depth probing ≤ 3 mm with negative bleeding) were collected initially and 60 days after a basic periodontal therapy, root scaling and oral hygiene instructions. Conventional PCR, qPCR and specific primers for it technique were used for microbiological analysis. To permit a comparative analysis between both PCR methods studied, the real time PCR was divided in 3 different scores, in accordance to DNA quantity and the conventional PCR in 2 scores, present or absent. The GraphPad software was used to make the statistical analysis. The results for the three bacteria analyzed presented similar results, the real time PCR demonstrated higher sensitivity and specificity in the detection of microorganisms. The concordance between both techniques was moderate, concluding that the real time PCR can be used in the detection and quantification of periodontopathogens.

Keywords: Polymerase chain reaction (PCR), *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerela forsythia*, Periodontal disease.

Introdução

A doença periodontal consiste em uma infecção, que difere das demais patologias por ser acometida por uma variedade de micro-organismos, particularmente anaeróbios Gram-negativos (Genco et al.¹³, 1996; Eick Pfister¹², 2002; Paster et al.²⁶, 2001) Dentre as principais espécies encontram-se o *Porphyromonas gingivalis*, *Tanerella forsythia* e *Treponema denticola* os quais podem ser identificados nos estados de saúde e doença periodontal. (Genco et al.¹³, 1996)

Dentre os diferentes métodos de identificação microbiana, a cultura bacteriana considerada o padrão ouro de diagnóstico microbiológico, é um método capaz de identificar novas espécies bacterianas, porém pode super-estimar resultados devido ao fato de alguns micro-organismos serem de difícil cultivo ou até mesmo não serem cultiváveis, como por exemplo, *Treponema ssp.* e *Tanerella forsythia*.(Tanner et al.³⁰, 1986; Sakamoto et al.²⁷, 2002). Por esse motivo, diferentes métodos alternativos de diagnóstico tem sido utilizados, como microscopia de campo escuro, ensaios imunológicos e enzimáticos, sondas de ácidos nucléico e a reação da polimerase em cadeia (PCR). (Chen, Slots⁸, 1999; Loomer²⁰, 2004; Jervoe-Storm et al.¹⁴, 2005).

O PCR tornou-se uma importante ferramenta de diagnóstico microbiológico, por ser um método rápido, sensível e específico na detecção de micro-organismos. Baseia-se na detecção de sequências específicas de DNA, e consegue distinguir espécies bacterianas semelhantes como *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*. (Jervoe-Storm et al.¹⁴, 2005; Nonnenmacher et al.²⁵, 2004).

O método de PCR convencional é efetivo na detecção de micro-organismos de difícil cultivo e detecta bactérias viáveis como não viáveis. Porém é limitado na quantificação do número de bactérias presentes em determinado sítio podendo não ser capaz de detectar micro-organismos em baixas quantidades. (Nonnenmacher et al.²⁵, 2004).

Com o desenvolvimento do PCR em tempo real (qPCR) muitos desses problemas puderam ser solucionados. Esta técnica possibilitou monitorar o aumento de produto de PCR durante toda a reação, permitindo quantificação inicial de DNA presente na amostra. É um método mais rápido e sensível, porém com custo elevado. (Nonnenmacher et al.²⁵, 2004)

Diversos estudos tem sido realizados para quantificar bactérias e outros organismos através do PCR em tempo real. Kuboniwa et al.¹⁶ (2004) e Boutaga et al.⁶ (2007) quantificaram periodontopatógenos presentes no fluido gengival de pacientes com doença periodontal e observaram que o PCR em tempo real dispensa tempo e trabalho do operador, sendo também específico e sensível na detecção e quantificação dos periodontopatógenos.

A exata detecção e quantificação de micro-organismos pode facilitar o monitoramento da terapia periodontal e permitir novas percepções do papel da patogênese periodontal e de bactérias periodontais não cultiváveis (Boutaga et al.⁶ 2007; Nonnenmacher et al.²⁵, 2004). O propósito do presente estudo foi realizar análise comparativa entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real na detecção dos micro-organismos *Porphyromonas gingivalis*, *Tanerella forsythia* e *Porphyromonas endodontalis* antes e após a terapia periodontal básica de Raspagem Alisamento Radicular e Instrução de Higiene Oral.

Material e Métodos

Cálculo da amostra

O cálculo da amostra foi baseado nos dados publicados em estudo prévio recente que utilizaram técnica de PCR em tempo real na detecção de patógenos (Jervoe-Storm et al.¹⁵, 2007, Verner et al.³⁴, 2006). Foi considerado o poder do teste de 90%, nível de significância de 5% e a diferença a ser detectada de 1,5mm e como parâmetro, a profundidade de sondagem. A diferença padronizada do poder de estudo em 0,95 ($1-\beta=0,95$) e um intervalo de confiança $\alpha=0,05$ determinou uma amostra de pelo menos 17 pacientes para receber o tratamento.

Para o presente estudo foram selecionados 20 pacientes considerando as possíveis perdas que poderiam ocorrer.

Para este estudo, 20 pacientes que procuraram a Clínica de Periodontia do curso de pós-graduação em Odontologia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP foram selecionados, sendo 8 homens e 12 mulheres, com idade entre 35 e 55 anos que apresentavam doença periodontal crônica moderada ou severa generalizada segundo os critérios estabelecidos pela Academia Americana de Periodontia. (Armitage², 1996) Os critérios de inclusão foram: 1) presença no mínimo de 20 dentes; 2) mínimo de 3 sítios não adjacentes com sangramento a sondagem (SS), perda de inserção $\geq 3\text{mm}$ e Profundidade de Sondagem (PS) $\geq 5\text{mm}$ e 3 sítios sadios com ausência de SS e PS $\leq 3\text{mm}$. Os critérios de exclusão foram: 1) tratamento periodontal nos últimos 12 meses; 2) doença sistêmica com interferência no processo saúde-doença periodontal; 3) uso de antibiótico nos últimos seis meses; 4) uso de anti-inflamatórios e antissépticos bucais nos últimos três meses; 5) gestação, amamentação ou uso de contraceptivos hormonais; 6) fumantes. Todos os indivíduos foram instruídos sobre o tratamento e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) aprovado para este estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (protocolo nº 26/08 - Anexo 1).

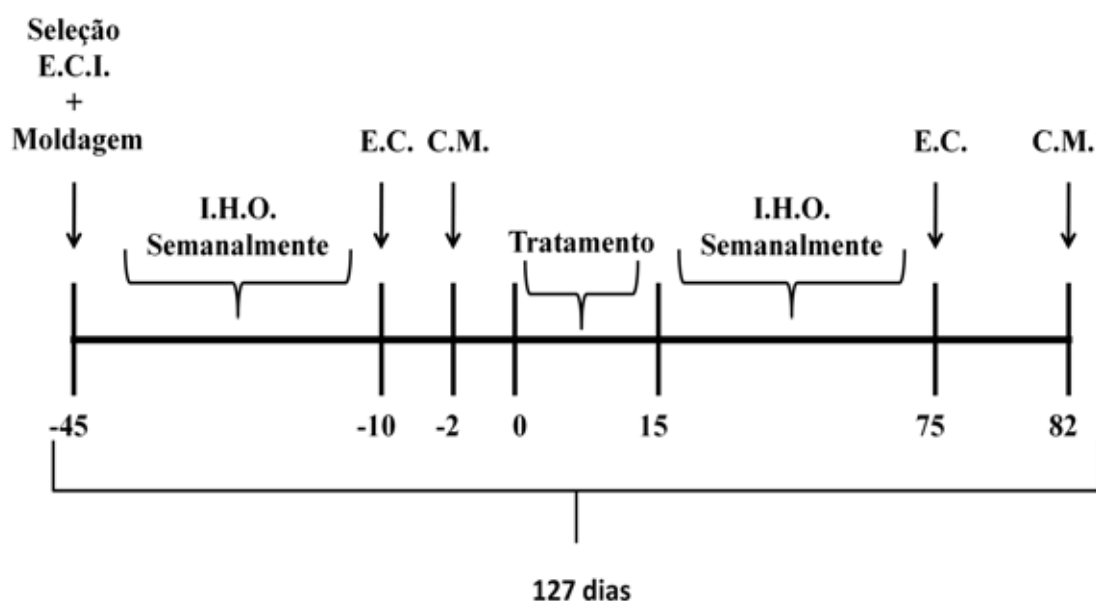
Calibração do Examinador

Para calibrar o examinador do estudo, 180 sítios apresentando profundidade de sondagem $\geq 5\text{mm}$ foram selecionados aleatoriamente em 10 pacientes (18 sítios por paciente em dentes multi e uni-radiculares). O examinador mensurou a profundidade da bolsa periodontal em 2 ocasiões, em um intervalo de 7 dias. Os dados foram submetidos a análise de concordância Kappa e obteve o valor de 0,915 com um intervalo de 95% de confiança. Portanto não houve diferenças estatisticamente significantes entre os exames e por isso o examinador foi considerado calibrado e cego para o grupo de estudo.

Delineamento clínico do estudo

Cronograma de Execução da Metodologia

O cronograma de execução da metodologia do presente estudo está ilustrado no Quadro 1.



Quadro 1: Cronograma de estudo **Legenda:** **E.C.I.:** Exame Clínico Inicial; **I.H.O.:** Instrução de Higiene Oral; **E.C.:** Exame Clínico; **C.M.:** Coleta Microbiológica.

Foram selecionados por paciente, dois sítios não adjacentes com $PS \geq 5\text{mm}$ e positivos para o SS e perda de inserção $\geq 3\text{mm}$ e dois sítios sadios não adjacentes com ausência de perda de inserção e SS, $PS \leq 3\text{mm}$. Os dentes selecionados não apresentavam qualquer disfunção em relação à oclusão, e não utilizavam próteses. No total foram selecionados 60 sítios sendo 30 sadios e 30 doentes.

Moldagens das arcadas dentais em alginato foram realizadas para a confecção de guias utilizando placas de poliacrileno de 1,0 mm de espessura com

objetivo de padronizar o posicionamento da sonda periodontal milimetrada durante a realização dos exames clínicos bem como no auxílio para a coleta do fluido crevicular. Um examinador cego e calibrado realizou todos os parâmetros clínicos. Outro operador diferente do examinador previamente treinado e calibrado realizou o tratamento periodontal básico seguido de Instrução de Higiene Oral.

Procedimentos iniciais

Trinta dias antecedentes ao início do tratamento periodontal, os pacientes receberam instrução de higiene oral semanalmente para utilização de escova dental pela técnica de Bass, fio dental e outros meios complementares (escova interdental, escova de língua) de acordo com as necessidades individuais de cada um. Após 30 dias de instrução de higiene oral, foi realizado o exame periodontal.

Exame clínico

Os pacientes foram submetidos ao exame periodontal completo, dez dias antes do baseline. Este foi realizado por um único examinador treinado, previamente calibrado e cego para o momento do estudo (Kappa ponderado = 0,91). O exame clínico foi realizado com o uso de sonda periodontal milimetrado tipo Willians[®].

Os parâmetros clínicos avaliados foram: Índice de Placa visível (IP)(Ainamo¹, 1975) e Índice de Sangramento Marginal (ISM) (Ainamo¹, 1975), os quais foram realizados em 4 pontos por dentes, Profundidade de Sondagem (PS), Nível de Inserção Clínica (NIC) e Sangramento a Sondagem (SS)(Muhlemann²⁴, 1971), o qual foi determinado pela presença (+) ou ausência (-) de sangramento observado durante 30 segundos, após a primeira inserção da sonda periodontal na bolsa. Os índices de PS, NIC e SS foram realizados em seis pontos diferentes por dente.

Coleta do fluido crevicular

As coletas foram realizadas sete dias após o exame clínico inicial e 60 dias após o término do tratamento periodontal básico. O biofilme bacteriano supragengival foi removido com o auxílio de gaze estéril, lavado e a área isolada com rolo de algodão. Dois cones de papel (nº 30) estéril foram introduzidos no sulco ou bolsa gengival até a porção mais apical e aguardou-se 30 segundos. Os cones foram inseridos em tubos tipo eppendorf estéril contendo 500 uL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) e congelados à -20°C até a extração do DNA para análise microbiológica por PCR em tempo real e PCR semi quantitativo.

Tratamento Periodontal Básico

Uma semana após o término da coleta microbiológica, os pacientes foram submetidos ao tratamento periodontal não-cirúrgico, instrução de higiene oral, raspagem e alisamento supragengival e subgengival em um período de quinze dias, sendo dois quadrantes por semana, sob anestesia local e instrumentação manual (Curetas Gracey, McCall, Limas Hirschifield) com duração de 45 a 60 minutos por quadrante. O polimento foi executado imediatamente após a RAR com taça de borracha e pasta profilática de granulação fina na região raspada em cada sessão. O tratamento foi realizado pelo profissional especialista em Periodontia diferente do examinador e cego para o grupo de estudo. Após o término da RAR foi realizado o controle do biofilme supragengival (fase de manutenção) e instrução de higiene oral semanalmente durante 60 dias, até que se realizasse a segunda coleta do fluido crevicular e exame periodontal.

Análise Microbiológica

As espécies bacterianas utilizadas *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Tanarella forsythia* (ATCC-43037) e *Porphyromonas endodontalis* (E203), foram cultivadas em câmara de anaerobiose a 37°C com 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂, para posterior confecção da curva padrão pela técnica de PCR em tempo real. O cultivo foi feito em placas contendo Tryptic soy broth (TSB)

suplementado (0,0001% extrato de levedura, 0,001% hemina menadiona, ágar e sangue)²¹. Após o crescimento bacteriano, cada micro-organismo foi transferido para tubos com 5ml TSB caldo e foram incubados novamente por um tempo que variava de acordo com as exigências fisiológicas de cada micro-organismo para seu crescimento até a fase exponencial. Após o crescimento e contagem de UFC/mL, os micro-organismos foram coletados, lavados, centrifugados e congelados a -20°C para posterior extração de DNA.

Extração de DNA

Foram retirados 100 microlitros (uL) de cada amostra bacteriana e a lise da célula foi extraída com a adição de 100 uL de Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1). O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf e o DNA foi precipitado a -20°C por 20 minutos acrescido da adição de 0,25 do volume de NaCl 5M e 2,5 do volume total de DNA de etanol absoluto gelado. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o DNA foi lavado com etanol 70%. Após evaporação total do etanol o precipitado foi ressuscitado em 50 µL de TE. A concentração de DNA foi determinada com espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 – Thermo Electron Corporation) a 260 nm, e a relação entre as absorbâncias a 260/280 nm foi analisada. Como parâmetro de qualidade, foi considerada como adequada entre 1,8-2,0. Foi realizada a leitura da concentração de cada micro-organismo.

Reação da polimerase em cadeia do tipo semi quantitativo – PCR

Os pares de oligonucleotídeos (5' – 3'), ou seja, os primers específicos para cada bactéria foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo – SP (Invitrogen Tech-LineSM). As sequências utilizadas para as bactérias estão descritas na Tabela 1.

Inicialmente a presença de DNA nas amostras obtidas dos pacientes foram confirmadas através de reação de polimerase em cadeia (PCR), realizada em termociclador convencional (MyCyclerTM thermal cycler - BioRad) utilizando oligonucleotídeos inespecíficos (Wilson et al.³⁵, 1990).

PC3mod = 5' GGACTAHAGGGTATCTAAT 3'

POmod= 5' AGAGTTTGATCMTGG 3'

A reação de PCR foi realizada em volume final de 25µL, contendo 1mM de cada oligonucleotídeo da bactéria específica (Invitrogen Tech-LineSM), 100 µM de dNTPs (Invitrogen Tech-LineSM) 1 a 2,5mM de Mg²⁺ e, de 1 a 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Tech-LineSM). Os tubos com as amostras foram submetidas ao Vortex por 10 segundos para homogeneização da solução e, em seguida, foi obtida uma alíquota de 2µL. Todas as reações foram realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico da bactéria em análise, e controle negativo, sem DNA molde (Tabela 2). O produto de PCR foi observado em eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio(0,5ug/ml) (Invitrogen Tech-LineSM), a uma corrente contínua de 100V por 90 minutos. A digitalização das imagens foram realizadas com o auxílio de um transluminador de luz ultravioleta e a seguir foi obtida imagem digitalizada do gel para documentação e posterior análise da presença ou ausência dos micro-organismos estudados. (Image Quant 100 – GE Healthcare)

Tabela 1. Oligonucleotídeos para a identificação de bactérias pela técnica de PCR convencional

Bactéria	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado	Referências
<i>P.gingivalis</i>	5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'	593 pb	Ashimoto et al. ³ , 1996
<i>T. forsythia</i>	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	641 pb	Ashimoto et al. ³ , 1996
<i>P. endodontalis</i>	5' GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC 3' 5' CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC 3'	672 pb	Tran, et al. ³¹ , 1997

Tabela 2. Condições de termociclagem e otimização de cada par de *primer*

<i>Primer</i>	Condição da reação	Concentração de Mg ²⁺	Unidades de Taq
<i>Primer inespecífico</i>	95 °C, 5min (1 ciclo); 96 °C, 30 seg, 45 °C, 30seg, 72 °C, 30seg (30 ciclos)	2,5mM	1U
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	2,5mM	1U
<i>Tannerella forsythia</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	1,5mM	1,25U
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 94 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 2min. (36 ciclos)	1,5mM	1,25U

Reações do PCR em tempo real (qPCR)

Os *primers* específicos para cada micro-organismo foram baseadas em estudos prévios e sintetizados pela Applied Biosystems® (Tabela 3).

Tabela 3: Primers específicos para detecção das espécies bacterianas através do PCR em tempo real

Bactéria	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado	Temperatura de Dissociação	Referências
<i>P.gingivalis</i>	5' ACC TTA CCC GGG ATT GAA ATG 3' 5' CAA CCA TGC AGC ACC TAC ATA GAA 3'	83 pb	77,09 °C	Kuboniwa et al. ¹⁶ , 2004
<i>T. forsythia</i>	5' AGC GAT GGT AGC AAT ACC TGT C 3' 5' TTC GCC GGG TTA TCC CTC 3'	88 pb	82,32°C	Kuboniwa et al. ¹⁶ , 2004
<i>P.endodontalis</i>	5'- GCT GCA GCT CAA CTG TAG TCT TG -3' 5'-TCA GTG TCA GAC GGA GCC TAG TAC-3'	110 pb	80,24°C	Martin et al. ²² , 2002

A utilização do SYBR Green exige a obtenção de produtos específicos de PCR e em função disso a eficácia das reações para os *primers* foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas.

As reações do PCR quantitativo foram realizadas utilizando o aparelho Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems®). Todas as reações foram realizadas em duplicatas em volume total de 10uL contendo 5uL Sybr Green ER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen Tech-LineSM), 0,1uM de cada par de oligonucleotídeo (Applied Biosystems®) e 1 uL de DNA. O volume foi ajustado com H₂O estéril livre de DNase e RNase. A termociclagem utilizada foi de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de PCR foi feita a curva de dissociação (curva de melting) com temperatura entre 60°C e 95°C para determinar a especificidade da reação de PCR. Todas as reações foram feitas em placas MicroAmp optical 48-well e adesivos ópticos (Applied Biosystems). Os dados foram analisados utilizando o programa Step One™ (Applied Biosystems®).

Para realização da curva padrão primeiramente foi utilizado o DNA extraído a partir da bactéria pura, onde foi feita a leitura em espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 – Thermo Electron Corporation) por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280 nm. Obteve-se uma concentração inicial entre 0,5 - 0,6 ug/uL de cada DNA bacteriano, em seguida realizou-se 8 diluições seriadas e após otimização foram selecionadas apenas 4 diluições por placa (10^4 - 10^7) para confecção da curva padrão.

A curva padrão (a qual possuía concentração conhecida) foi utilizada para converter os score de Ct (Cycle Treshold) obtidos com as amostras de fluido em números exatos de concentração de DNA.

Análise dos Resultados

Para comparação entre as técnicas de PCR convencional (método qualitativo) com o PCR em tempo real, houve a necessidade de realização de um score para ambas as técnicas para uma melhor correlação entre ambas, pois apenas

a dicotomização não seria possível devido a técnica do PCR em tempo real possuir 3 score. Para isso os resultados obtidos com o PCR em tempo real de acordo com a quantificação das amostras em comparação com os Ct (cycle threshold) da curva padrão foram divididos em: concentração $<10^6$ (score 1- amostras mais diluídas), concentração $\geq 10^6$ (score 2 - amostras com maior concentração de DNA) e ausência de amplificação (score 0).

Para a técnica PCR semi quantitativo, foi realizado dois scores: presente (score 1) e ausente (score 0), sendo possível correlacionar as duas técnicas.

Análise Estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise estatística utilizando o softwares GraphPad. Análises inter e intra grupos foram realizadas nos diferentes períodos.

As variáveis de boca toda dos indivíduos (Idade, PS, NI, SM, SS, IPV) foram analisadas através do teste t-pareado. As variáveis quantitativas (PS e NI) foram submetidas ao teste de normalidade (teste de aderência de Lilliefors). Os dados de PS e NI apresentaram distribuição não normal dos dados e foram analisados aplicando-se o teste de Wilcoxon para comparações entre grupos e entre períodos. Para as variáveis categóricas (IP, IG e SS e prevalência de bactérias), os dados foram submetidos ao teste de Cochran. Quando os resultados foram estatisticamente significantes, as amostras foram comparadas utilizando o teste exato de McNemar. Foi adotado o nível de significância de 5%. Para a prevalência de bactérias através de ambas as técnicas comparando o mesmo grupo em diferentes períodos foi utilizado o teste de Wilcoxon, por ser um índice de score e não dicotômico.

Para a comparação entre as técnicas, o PCR convencional foi tido como padrão por ser o método diagnóstico mais antigo em comparação ao PCR em tempo real. Foram adotados valores qualitativos e os seguintes parâmetros foram analisados:

- a. Sensibilidade através do número de amostras positivas para ambas as técnicas dividido pelo número de amostras positivas apenas pelo PCR convencional.
- b. Especificidade foi calculada pelo número de amostras negativas para ambas as técnicas dividido pelo número de amostras negativas somente para o PCR convencional,
- c. Valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, Razão de verossimilhança, e a concordância entre as técnicas foi analisada através do teste Kappa.

Resultados

As características da amostra como gênero, idade e número de dentes estão demonstrados na Tabela 4. Como pode ser observado a média de idade do grupo de estudo foi de $46 \pm 7,49$ sendo 8 homens (40%) e 12 mulheres (60%). A média do número de dentes foi de $23,55 \pm 2,95$, não sendo observado diferença estatisticamente significativa da idade e número de dentes da amostra em estudo.

Tabela 4 – Média no Baseline e desvio padrão (\pm DP): idade , número de dentes e gênero

Gênero	Idade (anos)		Dentes	
	Extensão	Média (DP)	Extensão	Média (DP)
Homem (8 / 40%)	35 – 54	42,50 (8,14)	20 – 28	24,00 (2,73)
Mulher (12 /60%)	36 – 56	48,33 (6,31)	18 – 28	23,25 (3,17)
Total (20 / 100%)	35 – 56	46,00 (7,49)	18 – 28	23,55 (2,95)

Tabela 5– Profundidade de Sondagem e Nível de Inserção no Baseline e 60 dias após a terapia periodontal (média \pm desvio padrão-DP)

	Profundidade de Sondagem (PS)		Nível de Inserção (NI)	
	Baseline	60dias	Baseline	60dias
Doentes	5,33 \pm 0,55*	3,63 \pm 0,76	5,40 \pm 0,62*	3,83 \pm 0,95
Sadios	1,6 \pm 0,56**	1,33 \pm 0,66	1,63 \pm 0,56**	1,36 \pm 0,61

* $p < 0.0001$, ** $p = 0,35$ (Teste de Wilcoxon comparando o mesmo grupo nos dois períodos)

As tabelas abaixo referem-se a comparação qualitativa entre as técnicas PCR convencional e PCR em tempo real, tendo como padrão o PCR convencional.

A técnica de PCR em tempo real foi capaz de detectar um número maior de amostras positivas para as bactérias em análise, quando comparados ao PCR convencional em ambos os grupos e períodos. O grupo doente apresentou uma quantidade significativamente maior de bactérias quando comparado ao grupo sadio em ambos os períodos.

Não será mencionado nos resultados descritivos abaixo o grupo sadio no período de 60 dias devido ao fato do PCR convencional não ter detectado nenhum micro-organismo, e o PCR em tempo real não detectou nenhuma bactéria no score 2, impossibilitando a aplicação de testes estatísticos.

Porphyromonas gingivalis

A tabela 6 e 7 ilustram a detecção de *P. gingivalis* por PCR convencional e PCR em tempo real.

Quando utilizou-se o score 1 como parâmetro, a técnica do PCR em tempo real detectou maior número de bactérias em ambos os grupos quando comparados ao PCR convencional. Estes dados refletem alta sensibilidade (100%) em ambos

os grupos e baixa especificidade para os grupos sadios e doentes no baseline e doentes após 60 dias respectivamente de 11%, 6% e 7%.

Entretanto ajustando o valor para o score 2, o número de bactérias detectadas pelo PCR em tempo real diminuiu em ambos os grupos mantendo boa sensibilidade de 50%, 100% e 67% respectivamente para sadios e doentes no baseline e 60 dias. O aumento da especificidade foi de 93%, 69% e 85%. Concomitantemente o valor de kappa aumentou no período do baseline de 0,02 para 0,35 no grupo sadio, 0,06 para 0,67 no grupo doente, e no período de 60 dias para o grupo doente de 0,02 para 0,36 mostrando assim moderada concordância entre as técnicas.

Tabela 6 – Comparação na detecção de *P. gingivalis* por PCR convencional e PCR em tempo real

Baseline	Sadios				Doentes					
	PCR	qPCR			Total	PCR	qPCR			Total
		0	1	2			0	1	2	
0	3	23	2	28	0	1	10	5	16	
1	0	1	1	2	1	0	0	14	14	
Total	3	24	3	30	Total	1	10	19	30	
60 dias	Sadios				Doentes					
	PCR	qPCR			Total	PCR	qPCR			Total
		0	1	2			0	1	2	
0	9	21	0	30	0	2	21	4	27	
1	0	0	0	0	1	0	1	2	3	
Total	9	21	0	30	Total	2	22	6	30	

Tabela 7 – Análise estatística para comparação entre as técnicas na detecção do *P. gingivalis*

Parâmetro	Baseline				60 dias			
	Sadios		Doentes		Sadios		Doentes	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Sensibilidade	100%	50%	100%	100%	ND	ND	100%	67%
Especificidade	11%	93%	6%	69%	ND	ND	7%	85%
VP+	7%	33%	48%	74%	ND	ND	11%	33%
VP-	100%	96%	100%	100%	ND	ND	100%	96%
Razão Veros.	1.08	1.44	1.90	3.80	ND	ND	1.12	1.44
Kappa	0.02	0.35	0.06	0.67	ND	ND	0.02	0.36

VP+: Valor preditivo positivo; VP-: Valor preditivo negativo; Razão de verossimilhança e o Nível de Concordância Kappa (k) por PCR convencional e PCR em tempo real com diferentes poderes de detecção score 1: $<10^6$ ou score 2: $\geq 10^6$), considerando o PCR convencional como padrão

Tanerella forsythia

As tabelas 8 e 9 ilustram a detecção de *T. forsythia* através do PCR convencional e PCR em tempo real)

A tabela 8 ilustra no grupo sadio no baseline 4 amostras positivas e 12 negativas para ambas as técnicas sendo que 2 delas foram positivas somente para o PCR convencional e 12 positivas apenas para o PCR em tempo real, mostrando sensibilidade de 67% e especificidade de 50% (Tabela 9). Quando o score passou para 2, vinte e quatro (24) amostras foram negativas para ambas e 5 passaram a ser positivas apenas para o PCR convencional, refletindo assim uma diminuição da sensibilidade para 17% e aumento da especificidade para 100% (Tabela 9). Concomitantemente o kappa passou de 0,13 para 0,36 mostrando moderada concordância entre ambas as técnicas.

No grupo doente no Baseline 15 amostras foram positivas para ambas as técnicas, 12 amostras positivas para o PCR em tempo real e 1 positiva para o PCR convencional resultando na sensibilidade de 94% e especificidade de 14% (Tabela

9). Quando o score foi ajustado para 2, treze amostras passaram a ser positivas para ambas as técnicas e 5 amostras positivas apenas para o PCR em tempo real, diminuindo a sensibilidade para 64% e aumentando a especificidade para 81%, refletindo no aumento do kappa de 0,06 para 0,46 obtendo assim moderada concordância entre as técnicas.

No período de 60 dias, apenas 1 amostra foi positiva e 10 amostras negativas para ambas as técnicas, mostrando sensibilidade de 100% e especificidade de 35% (Tabela 9). Quando o score passou para 2 o número de amostras negativas para ambas passou para 25, a sensibilidade manteve-se a mesma e houve aumento da especificidade para 86% com isso as técnicas passaram a ter moderada concordância ($k=0,53$).

Tabela 8 – Comparação na detecção de *T. forsythia* por PCR convencional e PCR em tempo real

Baseline	Sadios				Doentes					
	PCR	qPCR			Total	PCR	qPCR			Total
		0	1	2			0	1	2	
0	12	12	0	24	0	2	7	5	14	
1	2	3	1	6	1	1	2	13	16	
Total	14	15	1	30	Total	3	9	18	30	
60 dias	Sadios				Doentes					
	PCR	qPCR			Total	PCR	qPCR			Total
		0	1	2			0	1	2	
0	20	10	0	30	0	10	15	4	29	
1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
Total	20	10	0	30	Total	10	15	5	30	

Tabela 9 – Análise estatística para comparação entre as técnicas na detecção do *T. forsythia*

Parâmetro	Baseline				60 dias			
	Sadios		Doentes		Sadios		Doentes	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Sensibilidade	67%	17%	94%	81%	ND	ND	100%	100%
Especificidade	50%	100%	14%	64%	ND	ND	35%	86%
VP+	25%	100%	56%	72%	ND	ND	5%	20%
VP-	86%	83%	67%	75%	ND	ND	100%	100%
Razão Veros.	1.14	ND	1.50	2.70	ND	ND	1.05	1.25
Conc. Kappa	0.13	0.36	0.01	0.46	ND	ND	0.03	0.53

VP+: Valor preditivo positivo; VP-: Valor preditivo negativo; Razão de verossimilhança e o Nível de Concordância Kappa (k) por PCR convencional e PCR em tempo real com diferentes poderes de detecção score 1: $<10^6$ ou score 2: $\geq 10^6$), considerando o PCR convencional como padrão

Porphyromonas endodontalis

As Tabelas 10 e 11 ilustram a detecção de *P. endodontalis* através do PCR convencional e PCR em tempo real.

Quando utilizou-se o score 1, o PCR em tempo real detectou maior número de bactérias quando comparados ao PCR convencional, refletindo para o grupo sadio no baseline e doente no baseline e 60 dias respectivamente, uma sensibilidade de 100%, 88% e 83% e especificidade mais baixo 63%, 23% e 67% (Tabela 11). Ajustando o score para 2, o número de bactérias detectadas através do PCR em tempo real diminuiu e com isso a sensibilidade manteve-se a mesma em todos os grupos havendo aumento da especificidade. Concomitantemente o valor de kappa passou de 0,25 para 0,84 no grupo sadio mostrando excelente concordância entre as técnicas e para o grupo doente no baseline passou de 0,25

para 0,51 e no período de 60 dias de 0,35 para 0,63 mostrando boa concordância entre as técnicas analisadas.

Tabela 10 – Comparação na detecção de *P. endodontalis* por PCR convencional e PCR em tempo real

Baseline	Sadios				Doentes					
	PCR	qPCR			Total	PCR	qPCR			Total
		0	1	2			0	1	2	
	0	17	9	1	27	0	3	5	5	13
1	0	0	3	3	1	2	0	15	17	
Total	17	9	4	30	Total	5	5	20	30	

60 dias	Sadios				Doentes					
	PCR	qPCR			Total	PCR	qPCR			Total
		0	1	2			0	1	2	
	0	25	5	0	30	0	16	5	3	24
1	0	0	0	0	1	1	0	5	6	
Total	25	5	0	30	Total	17	5	8	30	

Tabela 11 – Análise estatística para comparação entre as técnicas na detecção do *P. endodontalis*

Parâmetro	Baseline				60 dias			
	Sadios		Doentes		Sadios		Doentes	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Sensibilidade	100%	100%	88%	88%	ND	ND	83%	83%
Especificidade	63%	96%	23%	61%	ND	ND	67%	87%
VP+	23%	75%	60%	75%	ND	ND	38%	62%
VP-	100%	100%	60%	80%	ND	ND	94%	95%
Razão Veros.	1.30	4.00	1.50	3.20	ND	ND	1.53	2.54
Conc. Kappa	0.25	0.84	0.25	0.51	ND	ND	0.35	0.63

VP+: Valor preditivo positivo; VP-: Valor preditivo negativo; Razão de verossimilhança e o Nível de Concordância Kappa (k) por PCR convencional e PCR em tempo real com diferentes poderes de detecção score 1: $<10^6$ ou score 2: $\geq 10^6$), considerando o PCR convencional como padrão.

Discussão

A presença de bactérias no fluido subgengival é específica para cada sítio e indivíduo, sendo que os sítios periodontalmente saudáveis diferem significativamente dos sítios doentes (Umeda et al.³², 1998). Estudos prévios sugeriram que o estado de saúde periodontal difere na prevalência de micro-organismos no meio subgengival (Paster et al.²⁶, 2001; Yang et al.³⁶, 2004; Lovegrove et al.²¹, 2004). Dentre as principais espécies de bactérias associadas a doença periodontal estão *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, que podem ser encontradas tanto em sítios sadios como em sítios com presença de doença periodontal. Novas bactérias estão sendo associadas a Doença Periodontal, como o caso do *P. endodontalis* e sua associação com a severidade da doença periodontal assim como a correlação com outros micro-organismos já consagrados na literatura (Kumar et al.¹⁷, 2003; Dahlen, Leonhardt¹⁰, 2006).

O cálculo da amostra foi baseado nos dados publicados em estudo prévio recente que utilizaram técnica de PCR em tempo real na detecção de patógenos (Jervoe-Storm et al.¹⁵, 2007, Verner et al.³⁴, 2006). Foi considerado o poder do teste de 90%, nível de significância de 5% e a diferença a ser detectada de 1,5mm e como parâmetro, a profundidade de sondagem. A diferença padronizada do poder de estudo em 0,95 ($1-\beta=0,95$) e um intervalo de confiança $\alpha=0,05$ determinou uma amostra de pelo menos 17 pacientes para receber o tratamento. Para o presente estudo foram selecionados 20 pacientes considerando as possíveis perdas que poderiam ocorrer.

Para análise microbiológica de periodontopatógenos, a cultura bacteriana é considerada o padrão ouro, entretanto possui algumas limitações como a detecção somente de micro-organismos viáveis, a inabilidade de crescimento de algumas espécies bacterianas e altas exigências de meios de cultura. Com isso métodos alternativos de diagnóstico surgiram para implementar essas limitações, como as reações em cadeia da polimerase. Esta técnica detecta micro-organismos viáveis e não viáveis, é um método mais específico e sensível, baseado na detecção de sequências específicas de DNA, e com isso consegue fazer a distinção de espécies bacterianas muito semelhantes, porém o PCR convencional não permite uma

quantificação exata do número de micro-organismos presentes. Dessa maneira, para permitir uma quantificação mais específica, técnicas como o PCR em tempo real surgiram com a capacidade de detectar a partir de 10 micro-organismos (Loomer²⁰, 2004; Bustin⁷, 2000).

A proposta do presente estudo foi realizar uma análise comparativa entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real na detecção de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. endodontalis* em amostras de fluido subgengival.

Para analisar a correlação entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real no presente estudo, foi utilizado dois limiares de detecção para o PCR em tempo real, levando-se em consideração que o limiar de detecção do PCR convencional é maior que o tempo real.

A escolha deste limiar foi realizada tomando-se por base os estudos de Conrads⁹ (1999) que recomendam que um corte de limiar deve ser feito para detectar somente quantidades relevantes de periodontopatógenos. Para isso após realização do PCR em tempo real e quantificação precisa da curva padrão em ug/ul foi realizado um corte nas amostras que possuíam uma concentração menor que a diluição 10⁶ug/ul (score 1) e maior que a diluição 10⁶ ug/ul (score 2). Para o PCR convencional foi considerado presente (score 1) e ausente (score 0).

Esta divisão foi realizada pelo fato dos periodontopatógenos estarem presentes em amostras saudáveis, porém em baixas concentrações, com isso através desta divisão foi possível detectar bactérias em todas as amostras e diferenciá-las de acordo com suas concentrações (Ximenez-Fyvie et al³³, 2000).

Os testes estatísticos escolhidos foram índices de sensibilidade especificidade e valor Kappa. Segundo o Laboratório de Epidemiologia e Estatística da USP o teste kappa é utilizado se analisar a intensidade de concordância entre dois métodos de diagnóstico, ou seja, o número de casos cujo o resultado é o mesmo para os dois testes. Valores próximos a 1 significa boa concordância entre os métodos diagnósticos.

De acordo com o Ministério da Saúde para saber quão preciso é um determinado teste, duas medidas foram criadas: a sensibilidade e a especificidade. A sensibilidade mede a capacidade do teste em identificar corretamente a doença

entre aqueles que a possuem, ou seja, o quão sensível é o teste (sabendo assim qual a chance de obtermos resultados falso positivo com determinado teste). A especificidade mede a capacidade do teste em excluir corretamente aqueles que não possuem a doença, ou seja, o quão específico o teste é (excluindo assim a possibilidade de um determinado testes obter resultados falso negativo).

Até o momento não foram encontrados relatos na literatura que comparassem estes dois métodos de diagnóstico na detecção de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. endodontalis*.

Para ambos os micro-organismos no grupo sadio após o tratamento não foi encontrado nenhum valor estatístico, isto porque através do método de PCR convencional todos os valores foram nulos, impossibilitando uma comparação dois a dois, devido a este fato não será explicado adiante.

P. gingivalis

Considerando a partir do score 1, os resultados obtidos com o PCR convencional no grupo doente e sadio em ambos os períodos, estes estão de acordo com os achados da literatura, os quais mostraram uma média entre 27-50% de sítios doentes e 13% de sítios sadios positivos para *P. gingivalis* (Sanz et al.²⁸, 2004, Lau et al.¹⁸, 2004).

Os resultados com o PCR em tempo real obtidos no presente estudo, mostram-se acima da média (96,6% para 93,3% no grupo doente e 90% para 70% no grupo sadio), encontrada na literatura que relatam uma média de 60% para sítios doentes e 15% para sítios sadios (Sanz et al.²⁸, 2004). Relatos da literatura sugerem que a utilização de *primers* que detectem pequenos fragmentos de DNA, levam a uma maior expressão destes micro-organismos (Lau et al.¹⁸, 2004). Além disso, a possibilidade de contaminação e a variação geográfica entre os países pode influenciar a quantificação de patógenos bucais encontrados. No Brasil a média encontrada para sítios doentes foi de 78% (Avila Campos, Velasquez-Melendez⁴, 2002).

Através dos resultados obtidos pode-se observar alta sensibilidade entre as técnicas, mostrando que a chance do PCR Convencional levar a um resultado

falso positivo é quase nula. Por outro lado a especificidade foi muito baixa principalmente no grupo sadio e doente após o tratamento periodontal, devido a baixa quantidade de DNA não detectável através do PCR convencional, mas sensível ao PCR em tempo real, gerando muitas vezes resultados falso negativo. Pobre concordância entre as técnicas ($k=0,02-0,06$) foi observada. Como descrito por Sanz et al.²⁸ (2004) apesar de ambas as técnicas serem mais sensíveis que o método de cultura e conseguirem detectar baixas quantidades de DNA, essa detecção pode ser irrelevante em termos de patogenicidade, devido ao fato da presença destes micro-organismos muitas vezes não gerarem a doença. A partir disso deve-se dar importância para a utilização do PCR em tempo real a fim de se quantificar exatamente o número de micro-organismos presentes e assim poder distinguir o limiar entre saúde e doença de um indivíduo.

Considerando o score 2, os resultados do PCR em tempo real diminuíram em ambos os grupos e com isso corroboram com os achados de Mineoka et al.²³ (2008) que detectaram *P. gingivalis* em 30% dos sítios saudáveis e 62,8% nos sítios doentes. Del Peloso Ribeiro et al.¹¹ (2008) encontraram a presença de 70% dos sítios com doença periodontal positivos para o *P.gingivalis* e após 3 meses do tratamento periodontal houve redução para 12%. Assim no presente estudo considerando o score 2 houve aumento da especificidade devido ao fato que aumentando o poder de detecção, os resultados falsos negativos que possam ser gerados pelo PCR convencional diminuem, obtendo-se assim concordância entre as técnicas ($k=0,35-0,67$). De acordo com Socransky et al.²⁹ (1998) para o desenvolvimento da doença periodontal é essencial a presença de periodontopatógenos, porém estes podem não ser suficientes para o estabelecimento da doença se este número não ultrapassar o limiar que gera a mesma.

T. forsythia

Considerando o score 1, a detecção obtida com o PCR convencional está de acordo com os estudos de Socransky et al.²⁹ (1998) que mostraram a presença

de maior quantidade de *P. gingivalis* e *T. forsythia* em sítio doentes quando comparados a sítios saudáveis. Resultados similares foram encontrados com o estudo de Del Peloso Ribeiro et al.¹¹ (2008) utilizando o sistema Sybr Green através do PCR em tempo real para avaliar a presença de periodontopatógenos antes e 3 meses após a terapia periodontal básica. Os autores observaram diminuição de 50% para 10% na detecção do *T. forsythia*.

Para o PCR em tempo real a detecção foi de 90% para 66,6% no grupo doente e para o grupo sadio foi de 53,3% para 33,3% após a terapia periodontal. Estes achados estão de acordo com os estudos de Lau et al.¹⁸ (2004) que detectaram a presença em 100% das amostras do grupo doente e 73% das amostras do grupo sadio positivas para *T. forsythia*. No Brasil a média de detecção para *T. forsythia* em sítios doentes foi de 82% (Avila Campos, Velasquez-Melendez⁴, 2002). Nos estudos de Boutaga et al.⁵ (2005) foi detectado a presença 89,2% das amostras doentes positivas para o *T. forsythia* corroborando com os achados do presente estudo.

Pode se observar que os valores de sensibilidade e especificidade estavam semelhantes no grupo sadio baseline. Isto se deve ao fato do PCR convencional ter detectado 2 amostras positivas sendo negativas para o PCR em tempo real. Relatos da literatura sugerem (Lau et al.¹⁸, 2004) algum tipo de contaminação durante a reação. Entretanto este fato foi descartado ao se repetir o experimento para este grupo e bactéria, observando-se pobre concordância entre as técnicas. Em relação aos demais grupos, observou-se baixo valor de especificidade, que pode estar relacionado com o limiar de detecção do PCR convencional e devido a alta porcentagem de detecção do PCR em tempo real em limiares inferiores aos detectáveis pelo PCR convencional gerados nestes resultados.

Quando o score foi considerado 2 os resultados obtidos com o PCR em tempo real corroboraram com os trabalhos de Mineoka et al.²³ (2008) ao detectar *T. forsythia* em 63,8% das amostras do grupo doente e 10% no grupo sadio através da técnica do PCR em tempo real.

Assim no grupo sadio no baseline a sensibilidade diminuiu muito devido ao fato do PCR convencional ter detectado 5 amostras que o PCR em tempo real não

detectou, interpretando como uma maior chance do PCR convencional levar a um resultado falso positivo. Uma das possíveis explicações pode ser em relação aos *primers* utilizados, os quais detectam também um recente filotipo desta espécie bacteriana reportado na literatura (BU063) o qual está relacionado com o estado de saúde gengival e tem a possibilidade de um mecanismo antagonista do *T.forsythia*.(Leys et al.¹⁹, 2002). Em relação aos demais grupos a sensibilidade manteve-se alta enquanto que a especificidade aumentou (64-100%), indicando que a maior parte dos micro-organismos detectados através do PCR em tempo real estavam em baixas quantidades. Entretanto quando se aumentou o score estes passaram a não ser detectadas pelo PCR em tempo real levando a melhor concordância entre as técnicas (k=0,36-0,56).

Estudos anteriores comparando a técnica de cultura bacteriana e PCR em tempo real mostraram pobre concordância entre as técnicas e alta sensibilidade do PCR na detecção do *T. forsythia* devido ao fato de ser um micro-organismo de difícil cultivo que pode gerar reações cruzadas com outros micro-organismos e possui altas exigências para seu crescimento (Lau et al.¹⁸, 2004, Jervoe-Storm et al.¹⁴, 2005, Boutaga et al.⁵, 2006).

Os estudos de Jervoe-Storm et al.¹⁴ (2005) concluíram que o PCR em tempo real mostrou ser um método sensível e específico na identificação de periodontopatógenos quando comparados aos métodos de cultura bacteriana.

P. endodontalis

São poucos os relatos na literatura sobre a presença deste patógeno na doença periodontal, com isso aqui estão relatados os trabalhos encontrados.

A detecção através do PCR convencional está de acordo com os achados de Kumar et al.¹⁷ (2003) e Tran et al.³¹ (1997) o qual detectaram a presença de 66% de *P. endodontalis* em amostras do grupo doente e 18% em amostras do grupo sadio.

Para o PCR em tempo real considerando o score 1 a detecção no grupo doente foi de 83,2% para 42% e no grupo sadio de 43,3% para 16%. Estes achados estão de acordo com o estudo de Dahlen, Leonhardt et al.¹⁰ (2006) que

através do checkerboard encontraram alta prevalência deste micro-organismo quando comparados aos sítios saudáveis.

Em relação a sensibilidade em ambos os scores obteve-se um bom resultado, devido ao fato de todas as amostras positivas para o PCR convencional terem sido para o PCR em tempo real. Em relação a especificidade quando se considerou o score 1, os resultados foram baixos devido ao fato de muitas amostras positivas para o PCR em tempo real não serem detectadas pelo PCR convencional gerando pobre concordância entre ambas as técnicas ($k=0,25-0,35$).

Quando o score passou a 2 a correlação entre ambas as técnicas melhorou e o PCR em tempo real passou a detectar apenas 66,6% no baseline e 26,6% após a terapia periodontal para o grupo doente e nos saudáveis baseline houve a detecção de 13,33%. No período de 60 dias nenhum micro-organismo foi detectado e estes valores estão de acordo com os achados de Kumar et al.¹⁷ (2003) já citado anteriormente.

Com isso a especificidade em ambos os grupos aumentaram significativamente, concluindo que vários micro-organismos estavam presentes em baixas concentrações não detectáveis pelo PCR convencional. Assim a partir do score 2 as técnicas passaram a ter uma ótima concordância ($k=0,51-0,84$), mostrando que as mesmas geraram resultados semelhantes.

No presente estudo pode-se concluir, que o método de PCR em tempo real mostrou ser uma técnica mais sensível e específica na detecção de micro-organismos quando comparados ao PCR convencional.

Quando considerado o score 1 observou-se pobre concordância entre as técnicas. Este fato pode ser explicado devido o PCR em tempo real conseguir detectar baixas quantidade de DNA (em torno de 10 bactérias) enquanto que o PCR convencional detecta a partir de 10^2 bactérias.

Quando utilizou-se o score 2 obteve-se boa concordância entre ambas, mesmo assim o PCR em tempo real mostrou melhores resultados, conseguindo detectar micro-organismo não sensíveis ao PCR convencional, devido ao fato também de necessitar de maiores otimizações para realização das reações.

Assim dentro dos limites do presente estudo o PCR em tempo real mostrou ser uma técnica eficiente na detecção e quantificação de periodontopatógenos, podendo com isso levar a uma melhor interpretação dos resultados através da quantificação exata de micro-organismos que geram a doença periodontal, pois apenas a presença do micro-organismo não significa que o sítio possa ser considerado doente.

Porém novos estudos devem ser realizados a longo prazo, para uma melhor validação da comparação entre ambas as técnicas.

Referências Bibliográficas

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25: 229-35.
2. Armitage GC. Periodontal diseases: Diagnosis *Ann Periodontol.* 1996; 1: 37-215.
3. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996;11: 266-73.
4. Avila-Campos MJ, Velásquez-Meléndez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, Brazil. *Revista do Inst Med Tropical de SP.* 2002; 44: 1–5.
5. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbrouck-Grauds CMJE, Savelkout PHM. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 427-433.
6. Boutaga K, et al. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2007; 78:79-86.
7. Bustin, SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25: 169–193.

8. Chen C, Slots J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 1999; 20: 53–64.
9. Conrads G. Molekularbiologische Verfahren in der Anaerobier, speziell Parodontitis-erreger-Diagnostik. *Mikrobiologie*. 1999; 9: 165-169.
10. Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21: 6–11
11. Del Peloso Ribeiro E, Bittencourt S, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. *J. Clin Periodontol*. 2008; 35: 789-798.
12. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial nucleic acid based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. 2002; 29: 638–644.
13. Genco RJ, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Ishikawa I, et al. Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontol*. 1996; 1: 926–932.
14. Jervøe-Strom PM, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 778-83.
15. Jervøe-Strom PM, Alahdab H, Koltzsch M, Fimmers R, Jepsen S. Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as analyzed by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2007; 78: 909-17.
16. Kuboniwa M, Amana A, Shizukuishi S. Hemoglobin-binding protein purified from *Porphyromonas gingivalis* is identical to lysine-specific

- cysteine proteinase(Lysgingipain). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249: 38-43.
17. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003; 82: 338-344.
 18. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. A Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:1061-9.
 19. Leys EJ, Lyons SR, Moeschnerger ML, Rumpf RW & Griffen AL. Association of *Bacteroides forsythus* and a novel *Bacteroides phylotype* with periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 821–825.
 20. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004; 34: 49-56.
 21. Lovegrove JM. Dental plaque revisited: Bacteria associated with periodontal disease. *J N Z Soc Periodontol.* 2004; 87: 7-21.
 22. Martin EF, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative Microbiological Study of Human Carious Dentine by Culture and Real-Time PCR: Association of Anaerobes with Histopathological Changes in Chronic Pulpitis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1698–704.
 23. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site Specific Development of Periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol.* 2008; 79: 670-676.
 24. Muhlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding-a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontolol Acta.* 1971; 107-113.

25. Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 2004; 59: 117-25.
26. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001; 183: 3770-83.
27. Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I. & Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1896) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *I J Systematic and Evolutionary Microbiol*. 2002; 52: 841–849.
28. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J. Clin Periodontol*. 2004; 31: 1034-47.
29. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, & Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin Periodontol*. 1998; 25: 134-144.
30. Tanner ACR, Listgarten MA, Ebersole JL & Strzempko MN. *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, fusiform Bacteroides sp. from human oral cavity. *Int J Systematic Bacteriol*. 1986; 36: 213–221.
31. Tran T, Flynn MJ, Chen C, Slots J. *Porphyromonas endodontalis* in subgingival plaque. *Clin Infect Dis*. 1997; 25: 222-3.
32. Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I, Slots J. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *J Periodontol*. 1998; 69: 828-33.

33. Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, & Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 648–57.
34. Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 341-6.
35. Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 1942-6.
36. Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol.* 2004;75: 1077-1083.

Capítulo 3: Detecção de *Porphyromonas endodontalis*,
Porphyromonas gingivalis e *Tannerella forsythia* em
amostras de fluido gengival. Análise clínica e
microbiológica.

Artigo a ser submetido para publicação

Resumo: Detecção de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* em amostras de placa subgengival. Análise clínica e microbiológica.

Aproximadamente 700 espécies de micro-organismos foram descritos e estão presentes na cavidade bucal. Algumas das espécies, relacionadas à doença periodontal incluem *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), enquanto outras espécies como o *Porphyromonas endodontalis* (*Pe*), estaria menos relacionado à essa patologia. O objetivo do presente estudo foi realizar análise clínica e microbiológica através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do PCR em tempo real na identificação de *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* em sítios doentes e sadios de pacientes com doença periodontal crônica generalizada antes e após a terapia periodontal básica. Foram selecionados 20 pacientes sistemicamente saudáveis, com doença periodontal. Após o exame clínico periodontal completo, 30 amostras de sítios doentes não adjacentes ($PS \geq 5$ e 7 mm com sangramento a sondagem) e 30 amostras de sítios sadios não adjacentes ($PS \leq 3$ mm e ausência de sangramento a sondagem) foram coletados antes e 60 dias após a terapia periodontal básica de raspagem, alisamento radicular e instrução de higiene oral. PCR convencional, PCR em tempo real e *primers* específicos para cada técnica foram utilizados para análise microbiológica. Os resultados demonstraram que em ambas as técnicas utilizadas, o *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* foram detectados em maiores proporções nos sítios doentes quando comparados aos sítios sadios. Após a terapia periodontal básica houve redução significativa das bactérias analisadas. Dessa forma, sugere-se que a presença do *P. endodontalis* pode influenciar na progressão da doença periodontal, e possui uma correlação positiva com as demais bactérias. O tratamento periodontal básico mostrou-se eficiente para a redução deste patógeno, e ambas as técnicas de biologia molecular mostraram-se eficazes na detecção dos periodontopatógenos.

Palavras-chave: *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, Reação em Cadeia da Polimerase.

Abstract

Detection of *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque sample. A clinical and microbiology study.

Objectives: It has been reported the presence of more than 700 species in periodontal disease, including *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* and others, such as the *Porphyromonas endodontalis*, that is correlated with periodontitis. The purpose of the present investigation was to make a clinical and microbiological analysis to identify and to quantify *P. endodontalis*, *P. gingivalis* and *T. forsythia* in subgingival plaque sample from patients presenting chronic periodontitis. **Methods:** Twenty systemically healthy patients with generalized chronic periodontitis were selected for the study. The patients were submitted to a clinical evaluation consisting primarily of probing depth (PD) and presence or not of bleeding on probing (BOP). The samples for microbiological analysis were collected before and 60 days after a basic periodontal therapy (scaling, root planning and oral hygiene instructions). Samples from 60 sites were collected, consisting of: 30 contaminated nonadjacent samples (PD between 5-7 mm and positive BOP) and 30 healthy nonadjacent samples (PD \leq 3 mm and negative BOP). Microbiological analysis was performed by conventional PCR (BioRad ®) and the Sybr Green Kit system (Invitrogen ®) by real-time PCR (Step One, Applied Biosystems ®), considering the use of specific primers for the different techniques and bacteria. Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism5®. **Results:** Non-healthy sites showed significantly higher *P. endodontalis* detection compared to healthy sites for both conventional PCR and real-time PCR. Similar result was obtained for *P. gingivalis* and *T. forsythia*. Basic periodontal therapy treatment significantly decreased all the bacteria detection in both groups. **Conclusions:** The presence of *P. endodontalis* may influence the progression of periodontal disease, and presents a positive correlation to others opportunistic pathogens described in the literature. The molecular biological techniques used

were effective to detect the pathogens, demonstrating that the basic periodontal treatment efficiently reduced them.

Keywords: *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, Polymerase chain reaction.

Introdução

A periodontite é uma doença infecciosa que possui como principal fator etiológico um complexo biofilme bacteriano que coloniza a região sulcular entre a superfície do dente e a gengiva marginal e levam a destruição dos tecidos de suporte, como tecido conjuntivo e osso alveolar até a perda do dente (Mineoka³² et al., 2008).

Um importante passo para compreender a patogênese desta e qualquer outra doença infecciosa causada por uma microbiota variada é obter descrições detalhadas das diversas espécies envolvidas, desde as mais prevalentes até as espécies menos abundantes (Roças, Siqueira³⁸, 2009; Huse et al.¹⁸, 2008).

Com isso o diagnóstico microbiológico baseado em cultura bacteriana ou técnicas de biologia molecular, como por exemplo, a Reação em cadeia da polimerase tornam-se ferramentas de grande valia no estudo e na compreensão dos micro-organismos envolvidos na patogênese da doença periodontal (Roças, Siqueira³⁸, 2009; Siqueira, Roças³⁹, 2009). Utilizando-se estes métodos, foi possível detectar aproximadamente 700 espécies bacterianas presentes no biofilme dental subgengival, sendo que parte destes micro-organismos estão na forma comensal na cavidade bucal, com potencial de transformar-se em oportunistas patogênicos. (Aas et al.¹, 2005; Holt, Ebersole¹⁶, 2005; Paster et al.³⁴, 2001; Persson et al.³⁵, 2008)

Os principais periodontopatógenos são os micro-organismos Gram-negativos anaeróbios restritos e facultativos (Jarvensivu et al.²⁰, 2004) sendo o *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tanerella forsythia*, as principais espécies bacterianas associadas a doença periodontal, possuindo importante papel na patogênese da mesma (Holt, Ebersole¹⁶, 2005; Mineoka et al.³², 2008; Siqueira, Roças³⁹, 2009). Entretanto não apenas uma espécie bacteriana ou grupo de patógenos tem sido identificados como fatores etiológicos da doença periodontal, mas também interações entre os micro-organismos e o hospedeiro (Kumar et al.²⁶, 2003).

Alguns estudos tem demonstrado a presença de novas espécies associados às doenças periodontais, (Paster et al.³⁴, 2001) e estes micro-organismos ainda necessitam ser melhor estudados a fim de se verificar a sua relação com essa patologia (Kumar et al.²⁶, 2003; Paster et al.³⁴, 2001). Dentre esses patógenos, merece destaque o *Porphyromonas endodontalis*, inicialmente encontrado em infecções originárias da polpa, mas também isolado de bolsas periodontais e outros sítios da cavidade bucal. Assim permanece uma lacuna para determinar sua prevalência e papel na doença periodontal (Kozarov et al.²⁴, 2006, Dahlén, Leonhardt⁹, 2006).

O *P. endodontalis* é um micro-organismo Gram-negativo anaeróbio restrito, porém seu mecanismo de patogenicidade não é muito bem reconhecido. Estudos de Dahlén, Leonhardt⁹ (2006) sugerem que *P. endodontalis*, *Prevotella tanneriae* e *Filifactor alocis* poderiam estar significativamente associadas com a doença periodontal por encontrarem-se em maiores concentrações em sítios doentes quando comparados à sítios saudáveis. Adicionado a isso, concluíram que essas três bactérias poderiam associar-se às bactérias rotineiramente diagnosticadas em pacientes com doença periodontal crônica, já descritas na literatura.

Assim o avanço nos métodos diagnóstico e desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, que possuem maior sensibilidade quando comparados a técnica de cultura bacteriana, permitem um melhor entendimento sobre o papel desses novos micro-organismos na patogênese da doença periodontal. O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença dos patógenos *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. endodontalis* e sua correlação com o estado de saúde e doença periodontal, em amostras de biofilme subgingival.

Material e Métodos

O cálculo da amostra foi baseado nos dados publicados em estudos prévios que utilizaram técnica de PCR em tempo real para a detecção de patógenos (Jervoe et al.²¹, 2007; Verner et al.⁴⁵, 2006). Foi considerado o poder do teste de 90%

nível de significância de 5% e a diferença a ser detectada de 1,5mm e como parâmetro, a profundidade de sondagem. A diferença padronizada do poder de estudo em 0,95 ($1-\beta=0,95$) e um intervalo de confiança $\alpha=0,05$ determinou uma amostra de pelo menos 17 pacientes para receber o tratamento. Para o presente estudo foram selecionados 20 pacientes considerando as possíveis perdas que poderiam ocorrer.

Para este estudo, 20 pacientes que procuraram a Clínica de Periodontia do curso de pós-graduação em Odontologia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP foram selecionados, sendo 8 homens e 12 mulheres, com idade entre 35 e 55 anos que apresentavam doença periodontal crônica moderada ou severa generalizada segundo os critérios estabelecidos pela Academia Americana de Periodontia (Armitage³, 1996) Os critérios de inclusão foram: 1) presença no mínimo de 20 dentes; 2) mínimo de 3 sítios não adjacentes com sangramento a sondagem (SS), perda de inserção ≥ 3 mm e Profundidade de Sondagem (PS) ≥ 5 mm e 3 sítios saudáveis com ausência de SS e PS ≤ 3 mm. Os critérios de exclusão foram: 1) tratamento periodontal nos últimos 12 meses; 2) doença sistêmica com interferência no processo saúde-doença periodontal; 3) uso de antibiótico nos últimos seis meses; 4) uso de anti-inflamatórios e antissépticos bucais nos últimos três meses; 5) gestação, amamentação ou uso de contraceptivos hormonais; 6) fumantes. Todos os indivíduos foram instruídos sobre o tratamento e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) aprovado para este estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP (protocolo nº 26/08 - Anexo 1).

Calibração do Examinador

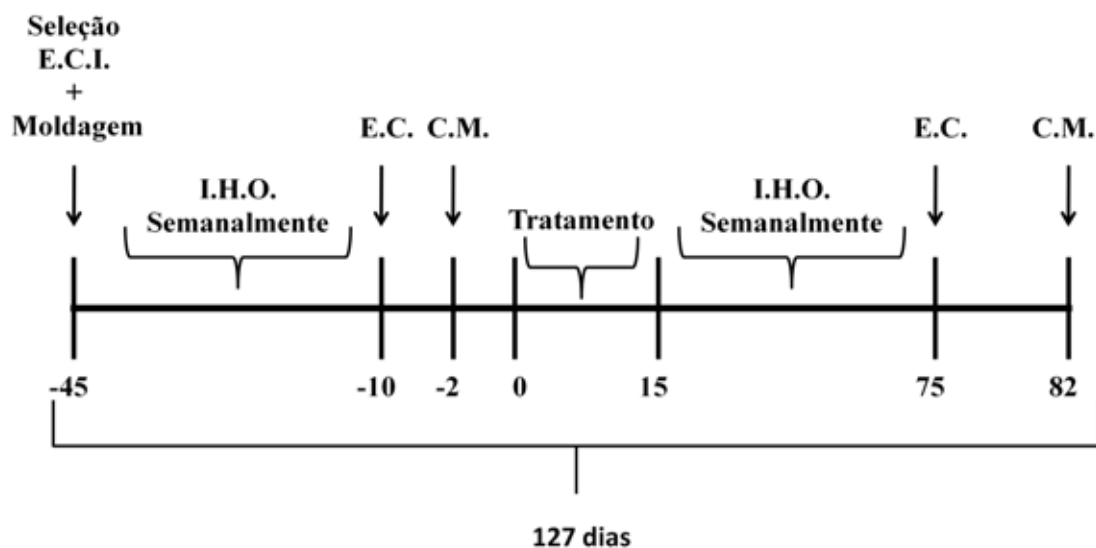
Para calibrar o examinador do estudo, 180 sítios apresentando profundidade de sondagem ≥ 5 mm foram selecionados aleatoriamente em 10 pacientes (18 sítios por paciente em dentes multi e uni-radiculares). O examinador mensurou a profundidade da bolsa periodontal em 2 ocasiões, em um intervalo de 7 dias. Os dados foram submetidos a análise de concordância Kappa e obteve o

valor de 0,915 com um intervalo de 95% de confiança. Portanto não houve diferenças estatisticamente significantes entre os exames e por isso o examinador foi considerado calibrado e cego para o grupo de estudo.

Delineamento clínico do estudo

Cronograma de Execução da Metodologia

O cronograma de execução da metodologia do presente estudo está ilustrado no Quadro 1.



Quadro 1: Cronograma de estudo **Legenda:** E.C.I.: Exame Clínico Inicial; I.H.O.: Instrução de Higiene Oral; E.C.: Exame Clínico; C.M.: Coleta Microbiológica.

Foram selecionados por paciente, dois sítios não adjacentes com $PS \geq 5\text{mm}$ e positivos para o SS e perda de inserção $\geq 3\text{mm}$ e dois sítios saudáveis não adjacentes com ausência de perda de inserção e SS, $PS \leq 3\text{mm}$. Os dentes selecionados não apresentavam qualquer disfunção em relação à oclusão, e não

utilizavam próteses. No total foram selecionados 60 sítios sendo 30 sadios e 30 doentes.

Moldagens das arcadas dentais em alginato foram realizadas para a confecção de guias utilizando placas de poliacrileno de 1,0 mm de espessura com objetivo de padronizar o posicionamento da sonda periodontal milimetrada durante a realização dos exames clínicos bem como no auxílio para a coleta do fluido crevicular. Um examinador cego e calibrado realizou todos os parâmetros clínicos. Outro operador diferente do examinador previamente treinado e calibrado realizou o tratamento periodontal básico seguido de Instrução de Higiene Oral.

Procedimentos iniciais

Trinta dias antecedentes ao início do tratamento periodontal, os pacientes receberam instrução de higiene oral semanalmente para utilização de escova dental pela técnica de Bass, fio dental e outros meios complementares (escova interdental, escova de língua) de acordo com as necessidades individuais de cada um. Após 30 dias de instrução de higiene oral, foi realizado o exame periodontal.

Exame clínico

Os pacientes foram submetidos ao exame periodontal completo, dez dias antes do baseline. Este foi realizado por um único examinador treinado, previamente calibrado e cego para o momento do estudo (Kappa ponderado = 0,91). O exame clínico foi realizado com o uso de sonda periodontal milimetrado tipo Willians[®].

Os parâmetros clínicos avaliados foram: Índice de Placa visível (IP)(Ainamo², 1975) e Índice de Sangramento Marginal (ISM) (Ainamo², 1975), os quais foram realizados em 4 pontos por dentes, Profundidade de Sondagem (PS), Nível de Inserção Clínica (NIC) e Sangramento a Sondagem (SS)(Muhlemann³³, 1971), o qual foi determinado pela presença (+) ou ausência (-) de sangramento observado durante 30 segundos, após a primeira inserção da

sonda periodontal na bolsa. Os índices de PS, NIC e SS foram realizados em seis pontos diferentes por dente.

Coleta do fluido crevicular

As coletas foram realizadas sete dias após o exame clínico inicial e 60 dias após o término do tratamento periodontal básico. O biofilme bacteriano supragengival foi removido com o auxílio de gaze estéril, lavado e a área isolada com rolo de algodão. Dois cones de papel (nº 30) estéril foram introduzidos no sulco ou bolsa gengival até a porção mais apical e aguardou-se 30 segundos. Os cones foram inseridos em tubos tipo eppendorf estéril contendo 500 uL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) e congelados à -20°C até a extração do DNA para análise microbiológica por PCR em tempo real e PCR semi quantitativo.

Tratamento Periodontal Básico

Uma semana após o término da coleta microbiológica, os pacientes foram submetidos ao tratamento periodontal não-cirúrgico, instrução de higiene oral, raspagem e alisamento supragengival e subgengival em um período de quinze dias, sendo dois quadrantes por semana, sob anestesia local e instrumentação manual (Curetas Gracey, McCall, Limas Hirschfield) com duração de 45 a 60 minutos por quadrante. O polimento foi executado imediatamente após a RAR com taça de borracha e pasta profilática de granulação fina na região raspada em cada sessão. O tratamento foi realizado pelo profissional especialista em Periodontia diferente do examinador e cego para o grupo de estudo. Após o término da RAR foi realizado o controle do biofilme supragengival (fase de manutenção) e instrução de higiene oral semanalmente durante 60 dias, até que se realizasse a segunda coleta do fluido crevicular e exame periodontal.

Análise Microbiológica

As espécies bacterianas padrões utilizadas *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Tanerella forsythia* (ATCC-43037) e *Porphyromonas*

endodontalis (E203), foram cultivadas em câmara de anaerobiose a 37°C com 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂, para posterior confecção da curva padrão pela técnica de PCR em tempo real. O cultivo foi feito em placas contendo Tryptic soy broth (TSB) suplementado (0,0001% extrato de levedura, 0,001% hemina menadiona, ágar e sangue)²¹. Após o crescimento bacteriano, cada micro-organismo foi transferido para tubos com 5ml TSB caldo e foram incubados novamente por um tempo que variava de acordo com as exigências fisiológicas de cada micro-organismo para seu crescimento até a fase exponencial. Após o crescimento e contagem de UFC/mL, os micro-organismos foram coletados, lavados, centrifugados e congelados a -20°C para posterior extração de DNA.

Extração de DNA

Foram retirados 100 microlitros (uL) de cada amostra bacteriana e a lise da célula foi extraída com a adição de 100 uL de Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1). O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf e o DNA foi precipitado a -20°C por 20 minutos acrescido da adição de 0,25 do volume de NaCl 5M e 2,5 do volume total de DNA de etanol absoluto gelado. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o DNA foi lavado com etanol 70%. Após evaporação total do etanol o precipitado foi ressuscitado em 50 µL de TE. A concentração de DNA foi determinada com espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 – Thermo Electron Corporation) a 260 nm, e a relação entre as absorvâncias a 260/280 nm foi analisada. Como parâmetro de qualidade, foi considerada como adequada entre 1,8-2,0. Posteriormente foi realizada a leitura da concentração de cada micro-organismo.

Reação da polimerase em cadeia do tipo semi quantitativo – PCR

Os pares de oligonucleotídeos (5' – 3'), ou seja, os primers específicos para cada bactéria foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo – SP (Invitrogen Tech-LineSM). As sequências utilizadas para as bactérias estão descritas na Tabela 1.

Inicialmente a presença de DNA nas amostras obtidas dos pacientes foram confirmadas através de reação de polimerase em cadeia (PCR), realizada em termociclador convencional (MyCycler™ thermal cycler - BioRad) utilizando oligonucleotídeos inespecíficos (Wilson⁴⁶ et al., 1990).

PC3mod = 5' GGACTAHAGGGTATCTAAT 3'

POmod= 5' AGAGTTTGATCMTGG 3'

A reação de PCR foi realizada em volume final de 25µL, contendo 1mM de cada oligonucleotídeo da bactéria específica (Invitrogen Tech-LineSM), 100 µM de dNTPs (Invitrogen Tech-LineSM) 1 a 2,5mM de Mg²⁺ e, de 1 a 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Tech-LineSM). Os tubos com as amostras foram submetidas ao Vortex por 10 segundos para homogeneização da solução e, em seguida, foi obtida uma alíquota de 2uL. Todas as reações foram realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico da bactéria em análise, e controle negativo, sem DNA molde (Tabela 2). O produto de PCR foi observado em eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio(0,5ug/ml) (Invitrogen Tech-LineSM), a uma corrente contínua de 100V por 90 minutos. A digitalização das imagens foram realizadas com o auxílio de um transluminador de luz ultravioleta e a seguir foi obtida imagem digitalizada do gel para documentação e posterior análise da presença ou ausência dos micro-organismos estudados. (Image Quant 100 – GE Healthcare).

Tabela 1. Oligonucleotídeos para identificação de bactérias por PCR convencional

Bactéria	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado	Referências
<i>P.gingivalis</i>	5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'	593 pb	Ashimoto et al. ⁴ (1996)
<i>T.forsythia</i>	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	641 pb	Ashimoto et al. ⁴ , (1996)
<i>P.endodontalis</i>	5' GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC 3' 5' CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC 3'	672 pb	Tran, et al. ⁴¹ , (1997)

Tabela 2. Condições de termociclagem e otimização de cada par de *primer*

<i>Primer</i>	Condição da reação	Concentração de Mg ²⁺	Unidades de Taq
<i>Primer inespecífico</i>	95 °C, 5min (1 ciclo); 96 °C, 30 seg, 45 °C, 30seg, 72 °C, 30seg (30 ciclos)	2,5mM	1U
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	2,5mM	1U
<i>Tannerella forsythia</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	1,5mM	1,25U
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 94 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 2min. (36 ciclos)	1,5mM	1,25U

Reações do PCR em tempo real (qPCR)

Os *primers* específicos para cada micro-organismo foram baseadas em estudos prévios e sintetizados pela Applied Biosystems[®] (Tabela 3).

Tabela 3: Primers específicos para detecção das espécies através do PCR em tempo real

Bactéria	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado	Temperatura de Dissociação	Referências
<i>P.gingivalis</i>	5' ACC TTA CCC GGG ATT GAA ATG 3' 5' CAA CCA TGC AGC ACC TAC ATA GAA 3'	83 pb	77,09 °C	Kuboniwa et al. ²⁵ , (2004)
<i>T.forsythia</i>	5' AGC GAT GGT AGC AAT ACC TGT C 3' 5' TTC GCC GGG TTA TCC CTC 3'	88 pb	82,32°C	Kuboniwa et al. ²⁵ , (2004)
<i>P.endodontalis</i>	5'- GCT GCA GCT CAA CTG TAG TCT TG -3' 5'-TCA GTG TCA GAC GGA GCC TAG TAC-3'	110 pb	80,24°C	Martin et al. ³¹ , (2002)

A utilização do SYBR Green exige a obtenção de produtos específicos de PCR e em função disso a eficácia das reações para os *primers* foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas.

As reações do PCR quantitativo foram realizadas utilizando o aparelho Step One™ Real Time PCR System (Applied Biosystems®). Todas as reações foram realizadas em duplicatas em volume total de 10uL contendo 5uL Sybr Green ER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen Tech-LineSM), 0,1uM de cada par de oligonucleotídeo (Applied Biosystems®) e 1 uL de DNA. O volume foi ajustado com H₂O estéril livre de DNase e RNase. A termociclagem utilizada foi de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de PCR foi feita a curva de dissociação (curva de melting) com temperatura entre 60°C e 95°C para determinar a especificidade da reação de PCR. Todas as reações foram feitas em placas MicroAmp optical 48-well e adesivos ópticos (Applied Biosystems). Os dados foram analisados utilizando o programa Step One™ (Applied Biosystems®).

Para realização da curva padrão primeiramente foi utilizado o DNA extraído a partir da bactéria pura, onde foi feita a leitura em espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 – Thermo Electron Corporation) por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280 nm. Obteve-

se uma concentração inicial entre 0,5 - 0,6 ug/uL de cada DNA bacteriano, em seguida realizou-se 8 diluições seriadas e após otimização foram selecionadas apenas 4 diluições por placa (10^4 - 10^7) para confecção da curva padrão.

A curva padrão (a qual possuía concentração conhecida) foi utilizada para converter os score de Ct (Cycle Treshold) obtidos com as amostras de fluido em números exatos de concentração de DNA.

Análise dos Resultados

Para comparação entre as técnicas de PCR convencional (método qualitativo) com o PCR em tempo real, houve a necessidade de realização de um score para ambas as técnicas para uma melhor correlação entre ambas, pois apenas a dicotomização não seria possível devido a técnica do PCR em tempo real possuir 3 score. Para isso os resultados obtidos com o PCR em tempo real de acordo com a quantificação das amostras em comparação com os Ct (cycle treshold) da curva padrão foram divididos em: concentração $<10^6$ (score 1- amostras mais diluídas), concentração $\geq 10^6$ (score 2 - amostras com maior concentração de DNA) e ausência de amplificação (score 0).

Para a técnica PCR semi quantitativo, foi realizado dois scores: presente (score 1) e ausente (score 0), sendo possível correlacionar as duas técnicas.

Análise Estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise estatística utilizando o softwares GraphPad. Análises inter e intra grupos foram realizadas nos diferentes períodos.

As variáveis de boca toda dos indivíduos (Idade, PS, NI, SM, SS, IPV) foram analisadas através do teste t-pareado. As variáveis quantitativas dos sítios coletados (PS e NI) foram submetidas ao teste de normalidade (teste de aderência de Lilliefors). Os dados de PS e NI apresentaram distribuição não normal dos dados e foram analisados aplicando-se o teste de Wilcoxon para comparações entre grupos e entre períodos. Para as variáveis categóricas (IP, IG e SS e

prevalência de bactérias), os dados foram submetidos ao teste de Cochran. Quando os resultados foram estatisticamente significantes, as amostras foram comparadas utilizando o teste exato de McNemar. Foi adotado o nível de significância de 5%. Para a prevalência de bactérias através de ambas as técnicas comparando o mesmo grupo em diferentes períodos foi utilizado o teste de Wilcoxon, por ser um índice de score e não dicotômico.

Resultados

As características da amostra como gênero, idade e número de dentes estão demonstrados na Tabela 4. Como pode ser observado a média de idade do grupo de estudo foi de $46 \pm 7,49$ sendo 8 homens (40%) e 12 mulheres (60%). A média do número de dentes foi de $23,55 \pm 2,95$, não sendo observado diferença estatisticamente significativa da idade e número de dentes da amostra em estudo.

Para descartar a possibilidade de infecção endodôntica, foi realizado exame radiográfico de todos os sítios coletados para analisar a presença ou ausência de lesão, sendo que nenhuma alteração endodôntica foi detectada nos sítios de coleta.

Tabela 4 – Média no Baseline e desvio padrão (\pm DP): idade , número de dentes e gênero

Gênero	Idade (anos)		Dentes	
	Extensão	Média (DP)	Extensão	Média (DP)
Homem (8 / 40%)	35 – 54	42,50 (8,14)	20 – 28	24,00 (2,73)
Mulher (12 /60%)	36 – 56	48,33 (6,31)	18 – 28	23,25 (3,17)
Total (20 / 100%)	35 – 56	46,00 (7,49)	18 – 28	23,55 (2,95)

Durante todo o tratamento periodontal os pacientes foram orientados a não utilizarem qualquer tipo de medicação como antibióticos ou anti-inflamatórios que pudessem vir a intervir na resposta ao tratamento.

Os gráficos 1, 2 e 3 representam as características clínicas da boca toda dos pacientes do presente estudo. O gráfico 1 representa a média das características clínicas de Índice de Placa Visível (IPV), Sangramento Marginal (SM) e Sangramento a Sondagem (SS). Pode-se observar que houve redução significativa ($p < 0.001$) de todos os parâmetros clínicos analisados quando comparados baseline e 60 dias após o tratamento.

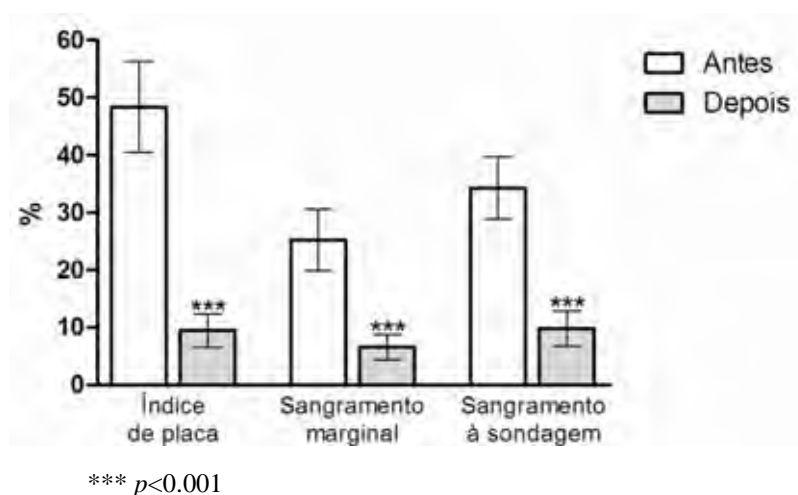
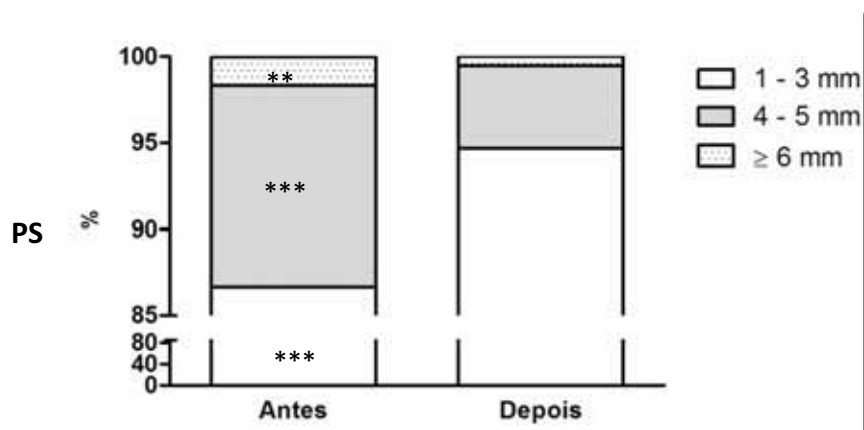


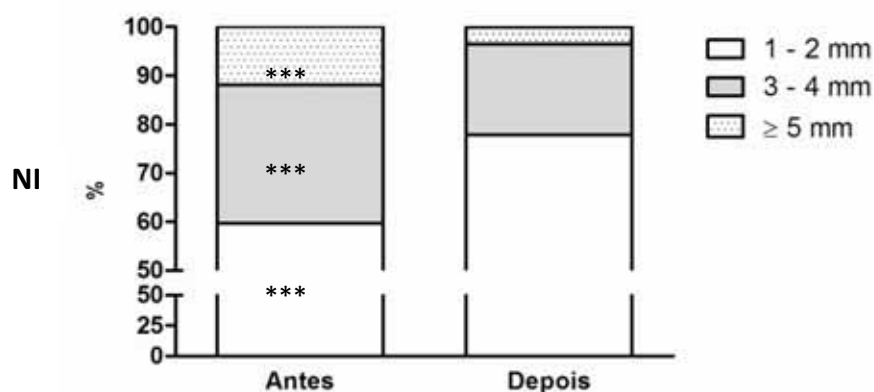
Gráfico 1 – Média (%) do índice de placa (IP), sangramento marginal (SM) e sangramento à sondagem (SS)

Os gráficos 2 e 3 representam a média da PS e NI, divididas em 3 scores PS (1-3mm; 4-5mm e ≥ 6 mm) e NI (1-2mm; 3-4mm e ≥ 5 mm). Conforme ilustra a figura no baseline, a PS apresentou 86% dos sítios com 1-3mm e 13,5% de 4-7 mm e o NI de 1-2mm (60%); 3-4mm (28,50%) e a ≥ 5 mm (11,54%). Após o tratamento, houve redução significativa da PS ($p < 0.001$, $p < 0.01$) e ganho de inserção estatisticamente significativo ($p < 0.001$).



** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Gráfico 2 - Dados agrupados (% de sítios) da profundidade de sondagem média em mm dos sítios, de acordo com o período. O eixo y foi fragmentado para facilitar a visualização dos dados

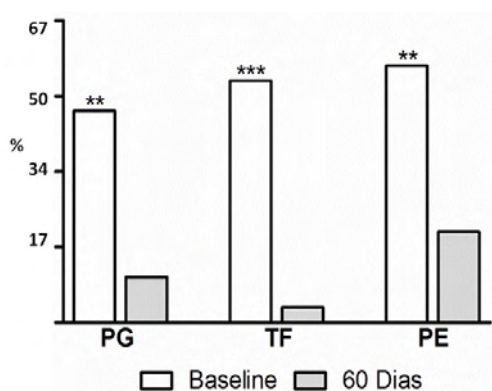


** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Gráfico 3 - Dados agrupados (% de sítios) do nível de inserção médio dos sítios, de acordo com o período. O eixo y foi fragmentado para facilitar a visualização dos dados

A Figura 1 representa esquematicamente os sítios coletados para análise microbiológica, sendo doentes ($n=30$) e sadios ($n=30$), antes e após tratamento periodontal. Observou-se no baseline, que 100% dos sítios doentes apresentavam sangramento a sondagem (SS) antes do tratamento periodontal. Entretanto, após o tratamento houve redução (13.33%) estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).

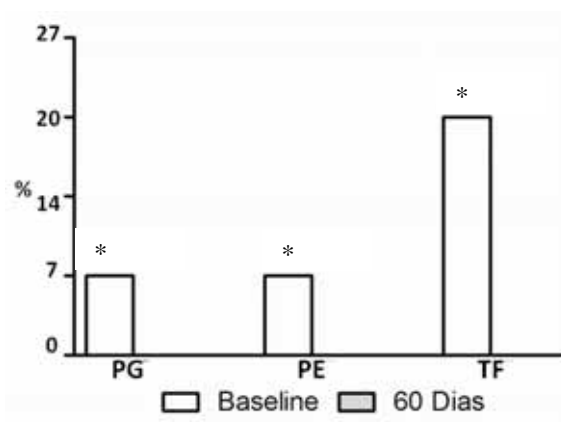
Observou-se ainda (Gráfico 4) redução estatisticamente significativa de *P. gingivalis* ($p<0.01$), *P. endodontalis* ($p<0.01$) e *T. forsythia* ($p<0.001$) para 10%, 20% e 3.3% respectivamente após o período de 60 dias. No grupo sadio (Gráfico 5), *T. forsythia* (20%), foi o micro-organismo mais frequente, enquanto que *P. gingivalis* (6,7%) e *P. endodontalis* (10%) foram menos detectados por PCR. Após o tratamento periodontal, observou-se redução total da presença dos micro-organismos em análise. A presença dos micro-organismos analisados diferiram estatisticamente entre os grupos doente e sadio, e no mesmo grupo do baseline para o 60 dias.



	Baseline	60dias
<i>P. gingivalis</i>	46,6% **	10%
<i>P. endodontalis</i>	56,6% **	20%
<i>T. forsythia</i>	53,3% ***	3,3%

* $p<0.05$, ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ (Teste de Wilcoxon, comparando os resultados obtidos nos diferentes períodos de observação, para cada uma das bactérias estudadas)

Gráfico 4: Detecção das bactérias (%) nos diferentes períodos para o grupo doente por PCR convencional.



	Baseline	60dias
<i>P. gingivalis</i>	6,6% *	0
<i>P. endodontalis</i>	10% *	0
<i>T. forsythia</i>	20% *	0

* $p<0.05$, ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ (Teste de Wilcoxon, comparando os resultados obtidos nos diferentes períodos de observação, para cada uma das bactérias estudadas)

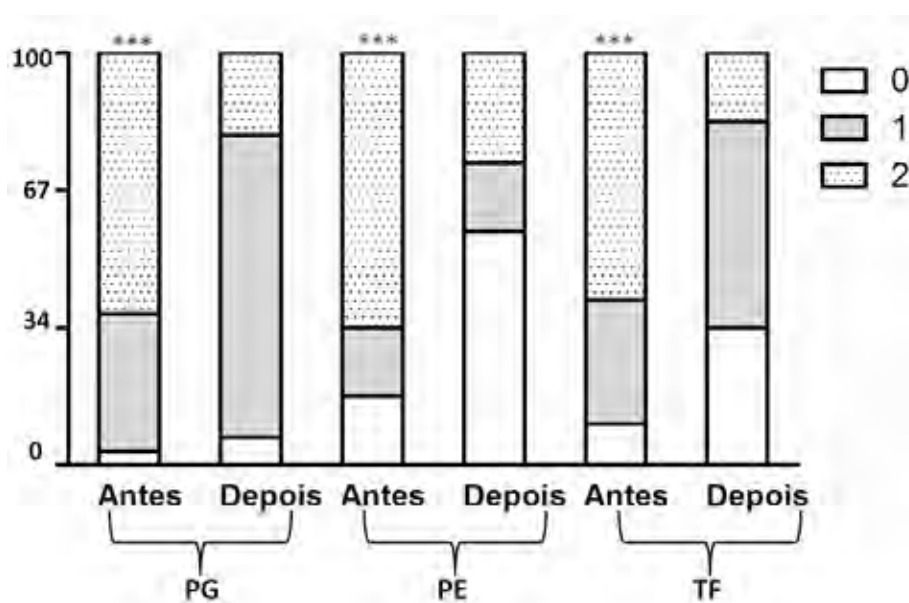
Gráfico 5: Detecção das bactérias (%) nos diferentes períodos para o grupo sadio por PCR convencional

Detecção dos micro-organismos através do PCR em tempo real (qPCR)

Os micro-organismos analisados foram detectados em concentrações estatisticamente significantes no grupo doente quando comparados ao grupo sadio. Para o grupo doente houve redução significativa das bactérias em análise, mas essas continuaram a serem detectadas após o tratamento periodontal.

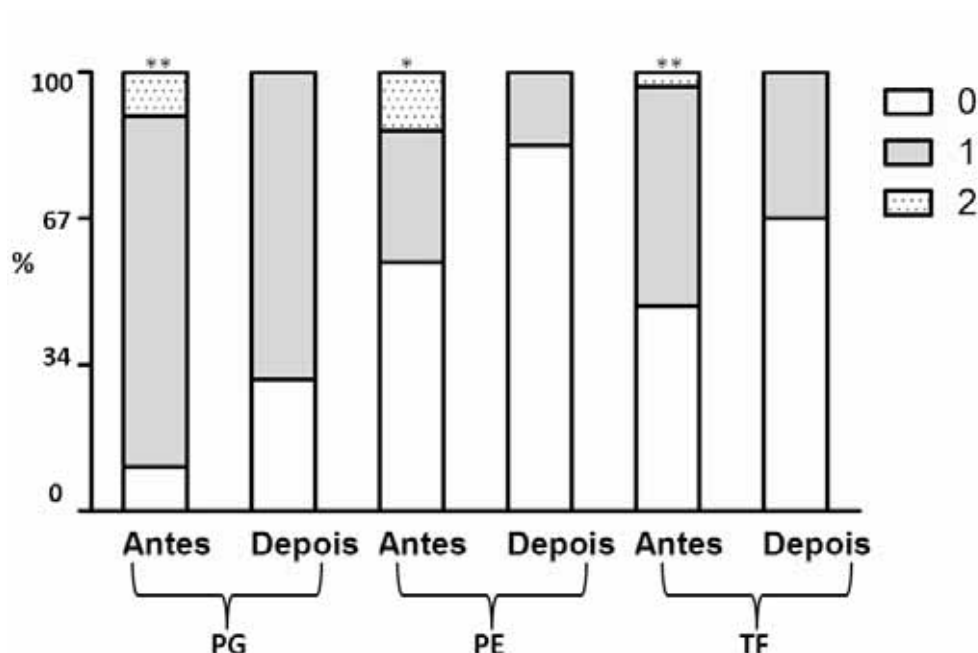
O Gráfico 6 ilustra o grupo de sítios com doença periodontal. Pode-se observar um aumento de *P. gingivalis* de 33,3% para 73,3% (score 1) e redução estatisticamente significativa de 63,3% para 20% (score 2). Para o *T. forsythia* houve aumento de 30% para 50% (score 1) e uma redução de 60% para 16,6% (score 2). Para o *P. endodontalis* não houve redução do score 1 enquanto que para o score 2 a redução foi de 66,6% para 26,6% do baseline para o período de 60 dias.

No grupo sadio (Gráfico 7) os micro-organismos não foram detectados no score 2 após o tratamento. Entretanto no score 1 a redução foi de 80% para 70% para o *P. gingivalis* ($p < 0.01$), de 50% para 33,3% para o *T. forsythia* ($p < 0.05$) e 30% para 16,6% para o *P. endodontalis* ($p < 0.01$).



*** $p < 0.001$ (teste de Wilcoxon)

Gráfico 6 – Detecção das bactérias (%) dos sítios doentes por PCR em tempo real



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (teste de Wilcoxon)

Gráfico 7 – Detecção das bactérias (%) dos sítios saudios por PCR em tempo real

Discussão

A presença de bactérias no fluido subgengival é sítio-dependente para cada indivíduo. Estudos prévios sugerem que o estado de saúde periodontal difere na prevalência de micro-organismos no meio subgengival (Paster et al.³⁴, 2001; Yang et al.⁴⁷, 2004; Lovegrove³⁰, 2004).

Existe um consenso na literatura científica de que a presença do biofilme dentário é um pré-requisito para o início e progressão das doenças periodontais. Dessa forma, algumas principais espécies de bactérias apresentam características importantes na patogênese da doença em decorrência de alguns fatores de virulência relacionados à inibição da defesa do hospedeiro como também a ativação de mediadores da inflamação relacionados a perda óssea alveolar. Associadas a doença periodontal estão *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*,

que podem ser encontradas tanto em sítios saudáveis como em sítios com presença de doença periodontal. Entretanto Kumar et al.²⁶, (2003) & Dahlen, Leonhardt⁹, (2006) sugerem que outros microrganismos podem estar associados a doença periodontal, como por exemplo, *P. endodontalis*.

A proposta do presente estudo foi avaliar a presença do *P. endodontalis* e sua correlação com *P. gingivalis* e *T. forsythia*, através da técnica de PCR convencional e PCR em tempo real, como também avaliar o efeito da terapia periodontal básica na diminuição destes micro-organismos no fluido gengival.

Os resultados de boca toda dos indivíduos analisados mostraram uma melhora significativa de todos os parâmetros clínicos (IP, ISM, SS, PS, NIC) após o tratamento periodontal de raspagem e alisamento radicular seguido de instrução de higiene bucal. Segundo Lindhe et al.^{28,29} (1983ab) e Haffajee et al.¹⁴ (1997), a RAR e instrução de higiene bucal são métodos básicos de tratamento periodontal já consagrados na literatura que possuem efeitos clínicos de diminuição da PS, SS e ganho de inserção satisfatório. Dessa maneira, os resultados encontrados no presente estudo corroboram com os achados de Del Peloso Ribeiro et al.¹⁰ (2008) que mostraram redução significativa da PS e SS após 3 meses do tratamento periodontal básico.

Em relação aos sítios coletados, o sangramento à sondagem foi utilizado como parâmetro indicativo do estado inflamatório dos tecidos subgengivais, portanto, mais relacionados ao biofilme subgengival e atividade de doença periodontal destrutiva (Chaves et al.⁷, 1993). Embora, em geral, demonstre-se uma associação limitada entre sangramento à sondagem e perda de inserção futura (Claffey et al.⁸, 1990). Os estudos de Haffajee et al.¹³ (1983), Lang et al.²⁷ (1990), Grossi et al.¹² (1994) afirmam que o sangramento não pode ser considerado como um bom preditor da perda de inserção futura. No entanto, sabe-se que a ausência de sangramento à sondagem está preferencialmente, associada à ausência de progressão da perda de inserção (Lang et al.²⁷, 1990; Chaves et al.⁷, 1993). Com isso no grupo doente houve uma melhora significativa do SS ($p < 0.0001$) do baseline (100%) para 60 dias (33%) e estes resultados estão de acordo com estudos clínicos anteriores onde observou-se significativa redução de SS em

comparação com o baseline. (Haffajee et al.¹⁴, 1997; Hanazowa et al.¹⁵, 1985; Hujoel & Loesche¹⁷, 1990).

Para os parâmetros de PS e NI houve diminuição significativa da PS ($p<0.001$) com média de 5,33mm para 3,63mm e ganho de inserção clínica médio de 1,51mm ($p<0.001$). Estes achados estão de acordo com os trabalhos de Pihlstrom et al.³⁶ (1983), Ramjord et. al.³⁷ (1997) e Becker et. al.⁵ (1988) que mostraram os benefícios clínicos da RAR em relação a redução da inflamação, diminuição da bolsa e ganho de inserção.

Nos sítios sadios não houve diferença estatística entre o baseline e 60 dias em relação a profundidade de sondagem ($p=0.035$), sendo que alguns sítios apresentaram perda de inserção devido aos efeitos clínicos de raspagem e alisamento radicular. Esses resultados corroboram com o estudo de Becker et. al.⁵ (1988) que demonstraram que sítios que apresentam sulcos rasos podem ter perda de inserção após o tratamento periodontal devido ao trauma mecânico causado pela instrumentação manual.

No presente estudo foi avaliado por PCR convencional e PCR em tempo real a presença de dois periodontopatógenos já descritos na literatura (*P. gingivalis* e *T. forsythia*) e um novo patógeno que vem sendo associado com a doença periodontal (*P. endodontalis*) e suas possíveis correlações com os estados de saúde e doença periodontal.

Através da técnica de PCR convencional os patógenos *P. gingivalis* e *T. forsythia* foram encontrados em maiores proporções respectivamente, 46% e 53% nos sítios doentes e após o tratamento periodontal houve uma redução significativa para 10% e 3,3%. O mesmo ocorreu para *P. endodontalis*, ou seja, houve redução significativa de 56% para 20% após o tratamento. Também pode-se observar que houve diferença estatística entre os micro-organismos, e os mesmos estavam em maiores proporções nos sítios doentes quando comparados aos sítios sadios que possuíam respectivamente no Baseline 6,6%, 20% e 10% de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. endodontalis* respectivamente. Após o tratamento periodontal nenhum micro-organismo foi encontrado. Estes achados corroboram com os trabalhos de Van Winkelhoff et al.⁴⁴ (2002) que avaliaram a presença dos

patógenos *T. forsythia* e *P. gingivalis* através de métodos de cultura bacteriana, e com os achados de Boutaga et. al.⁶ (2006), que detectaram a presença destes dois micro-organismos em maiores quantidades em sítios doentes quando comparados a sítios saudáveis. Em outro estudo, Ashimoto et. al.⁴ (1996) avaliaram a presença de *T. forsythia* e outros micro-organismos na doença periodontal e encontraram mais de 70% de sítios com presença deste patógeno, mostrando o potencial patogênico do mesmo. Estas duas bactérias podem ser encontradas frequentemente em sítios doentes assim como em sítios saudáveis. Segundo Holt, Ebersole¹⁶ (2005) e Kesavalu et al.²² (2007), *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* levam a um processo imunoinflamatório e conseqüentemente reabsorção óssea, caracterizando assim a influência desses micro-organismos no processo de doença periodontal.

No presente estudo, utilizando o método de PCR em tempo real pode-se observar maior detecção dos três patógenos nos sítios doentes e saudáveis quando comparados ao PCR convencional, e redução significativa após a terapia periodontal, embora ainda continuaram a ser detectados. Este fato pode ser explicado devido ao poder de detecção do PCR em tempo real ser maior que o convencional, possibilitando melhor caracterização dos micro-organismos presentes na microbiota periodontal. Resultados semelhantes mostraram que patógenos putativos podem estar presentes em sítios periodontalmente saudáveis, porém estes se encontram em número significativamente menor quando comparados a sítios doentes, significando que a patogenicidade da microbiota difere de cada região encontrada, e a forma pelo qual um indivíduo se torna susceptível a esta microbiota difere de um para outro indivíduo (van Winkelhoof et al.⁴⁴, 2002). Haffajee et al.¹⁴ (1992) demonstraram que para o desenvolvimento da doença periodontal é essencial a presença de espécies patogênicas, mas não necessário para o desenvolvimento da doença periodontal se estes micro-organismos não ultrapassarem o limite para se tornarem putativos.

A literatura científica vem demonstrando que a técnica de PCR em tempo real é uma ferramenta de grande valia para diagnosticar e quantificar a presença de pequenas quantidades de periodontopatógenos em amostras de fluido

subgingival em sítios doentes como também em sítios saudáveis. (Boutaga et al.⁶, 2006; Mineoka et al.³², 2008)

No presente estudo utilizando a identificação através do PCR em tempo real dos três micro-organismos no grupo doente, os resultados mostraram similaridade entre eles, ou seja, houve redução na concentração de *P. gingivalis* de 33,3% (score 1) e 63% (score 2) para 73% (score 1) e 20% (score 2) no período de 60 dias. O mesmo aconteceu com *T. forsythia* com valores de 30% de amostras positivas (score 1) e 60% (score 2) para 50% (score 1) e 16% (score 2). Por fim para *P. endodontalis* os valores foram de 16% de amostras positivas (score 1) e 60% (score 2) para 16% (score 1) e 26% (score 2) após a terapia periodontal. Dessa forma, pode-se observar que as bactérias continuaram presentes após o tratamento periodontal, mas com redução estatisticamente significativa na quantidade das mesmas passando do score 2 para o score 1 nos sítios doentes, sugerindo que *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. endodontalis* podem influenciar na progressão na doença periodontal, por se encontrarem em menores concentrações no fluido crevicular após a terapia periodontal básica. Resultados de Kumar et al.²⁶ (2003) mostraram a presença de três novos patógenos associados a doença periodontal, *F. alocis*, *P. tanneriae* e *P. endodontalis* sendo que estes apresentavam-se em maiores proporções em sítios doentes quando comparados a sítios saudáveis e em proporções semelhantes a outros patógenos como *P. gingivalis*, mostrando que esses três patógenos possuíam potencial de influenciar na progressão da doença periodontal. (Kumar et al.²⁶, 2003)

O patógeno *P. endodontalis* foi primeiramente reconhecido em infecções endodônticas por Sundqvist⁴⁰ (1976) e van Winkelhoff et al.⁴³ (1985). Considerando-se a similaridade entre a microbiota da doença periodontal e infecções pulpares verificou-se que tal micro-organismo também possa ser detectado em bolsas periodontais na mesma proporção. Este patógeno já foi identificado na microbiota subgingival de humanos, entretanto a sua associação com a doença periodontal não está muito bem estabelecida, e existem poucos relatos na literatura que mostram a sua prevalência na doença periodontal e o

efeito do tratamento periodontal na sua diminuição. (Downes et al.¹¹, 2001; Hultter et al.¹⁹, 2003, Uematsu et al.⁴², 2003)

É verdadeira a similaridade entre *P. endodontalis* e *P. gingivalis*, que é um dos principais micro-organismos presentes na doença periodontal. Entretanto ambos possuem características fenotípicas distintas, e nenhuma reação cruzada entre ambos foi mostrado na literatura utilizando técnicas moleculares, concluindo assim que os resultados obtidos com o presente estudo não poderiam ser da detecção do *P. gingivalis*, já que primers específicos foram sintetizados para tal finalidade.(Dahlen, Leonhardt⁹ 2006). Alguns trabalhos mostraram que a forma de adesão do *P. endodontalis* às células epiteliais do sulco gengival diferem do *P. gingivalis* por não possuírem fimbrias que auxiliam neste mecanismo, possuindo assim menor habilidade de adesão as células sulculares quando comparados ao *P. gingivalis*.(Kon²³, 2002)

Esses resultados corroboram com os achados de Dahlen, Leonhardt⁹ (2006) que avaliaram a presença de 12 novos patógenos associados com início e progressão da doença periodontal em relação aos antigos patógenos descritos na literatura e concluíram que o *P. endodontalis* pode ser adicionado aos micro-organismos utilizados como diagnóstico microbiológico da doença periodontal.

Portanto o presente estudo vem contribuir e adicionar à literatura resultados satisfatórios empregando-se técnicas moleculares como o PCR e particularmente o PCR em tempo real. Os resultados aqui apresentados sugerem que as respectivas técnicas empregadas podem servir como excelentes ferramentas de diagnóstico na identificação de micro-organismos na microbiota subgengival. Adicionado a isso, o PCR em tempo real pode detectar espécies bacterianas tanto em sítios doentes como em sítios saudáveis no mesmo indivíduo, devido a alta sensibilidade deste tipo de metodologia em conseguir identificar e quantificar baixas quantidades de DNA.

Com o auxílio das técnicas empregadas, os patógenos *P. gingivalis* e *T. forsythia* usados rotineiramente como diagnóstico em amostras da microbiota subgengival, confirmaram sua associação com os casos de doença periodontal, ou seja, foram encontrados em maior quantidade em sítios doentes quando

comparados a sítios saudáveis. Sugere-se que o patógeno *P. endodontalis* poderá ser incluído como micro-organismo rotineiramente diagnosticado na microbiota subgingival, com potencial patogênico devido a sua associação com *P. gingivalis* e *T. forsythia* em maiores proporções em sítios com doença periodontal em comparação aos sítios saudáveis.

Porém ainda existem poucos estudos na literatura que mostram esta associação do *P. endodontalis* nos casos de doença periodontal. Dessa maneira, novos estudos longitudinais e controlados deverão ser realizados para se avaliar o potencial patogênico do *P. endodontalis* ao longo do curso da doença periodontal e o efeito do tratamento periodontal a longo prazo na sua eliminação.

Referências Bibliográficas

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5721-32.
2. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25: 229-35.
3. Armitage GC. Periodontal diseases: Diagnosis *Ann Periodontol.* 1996; 1: 37-215.
4. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996;11: 266-73.
5. Becker W, Becker BE, Ochsenbein C, Kerry, GJ, Caffesse R, Morrison EC, et al. A longitudinal study comparing scaling, osseous surgery and modified Widman procedures. Results after 1 year. *J Periodontol.* 1988; 59: 351-65.
6. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbrouck-Grauds CMJE, Savelkout PHM. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol.* 2006; 33: 427-433.

7. Chaves ES, Wood RC, JONES AA, Newbold DA, Manwell MA, Kornman KS. Relationship of “bleeding on probing” and “gingival index bleeding” as clinical parameters of gingival inflammation. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 139-143.
8. Claffey N, Nylund K, Kiger R, Garret DA, Egelberg J. Diagnostic predictability of scores of plaque, bleeding suppuration and probing depth for probing attachment loss. 3 ½ years of observation following initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 1990; 17:108-114.
9. Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 6–11
10. Del Peloso Ribeiro E, Bittencourt S, Sallum EA, Nociti FH Jr, Gonçalves RB, Casati MZ. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 789-798.
11. Downes J, Munson MA, Spratt DA, Ko-nonen E, Tarkka E, Jousimies-Somer H, et al. Characterization of Eubacterium-like strains isolated from oral infections. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 947–951.
12. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Kock G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assesment of risk for periodontal disease. Risk indicators for attachment loss. *J. Periodontol.* 1994; 65: 260-267.
13. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson M. Comparision of different data analysis for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol.* 1983; 10: 298-310.
14. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr. RL. Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 324-34.
15. Hanazowa S, Nakasa K, Ohmori Y, Miyoshi T, Amano S, Kitano S. Functional role of interleukin–1 in periodontal disease: induction of

- interleukin 1 production by *Bacteroides gingivalis* lipopolysaccharides in peritoneal macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Infect Immun.* 1985; 50: 262-70.
16. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: The “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005; 38: 72-122.
 17. Hujoel PP & Loesche WJ. Efficiency of split-mouth designs. *J Clin Periodontol.* 1990; 17: 722-8.
 18. Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Mark Welch D, Relman DA, Sogin ML. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *Plos Genet.* 2008; 4: epub.
 19. Hutter G, Schlagenhaut U, Valenza G, Horn M, Burgemeister S, Claus H, et al. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phlotypes and putative pathogens. *Microbiol.* 2003; 149: 67–75.
 20. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. Candida yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis.* 2004; 10: 106-12.
 21. Jervøe-Storm PM, Alahdab H, Koltzsch M, Fimmers R, Jepsen S. Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as analyzed by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2007; 78: 909-17.
 22. Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, Matthews C, Dawson D, Steffen M, et al. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infect Immun.* 2007; 75: 1704-1712.
 23. Kon A. Pathogenic factors of *Porphyromonas endodontalis*. *Dent J Iwate Medical University.* 2002; 27: 187-196.

24. Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulsk-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect.* 2006; 8: 687-93.
25. Kuboniwa M, Amana A, Shizukuishi S. Hemoglobin-binding protein purified from *Porphyromonas gingivalis* is identical to lysine-specific cysteine proteinase(Lysgingipain). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249: 38-43.
26. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003; 82: 338-344.
27. Lang NP, Joss A, Orsanic T, Gusberti FA, Siegrist BE. Bleeding on probing. A predictor for progression of periodontal disease? *J. Clin Periodontol.* 1986; 13: 590-596.
28. Lindhe J, Liljenberg B, & Adielsson B. Effect of long-term tetracycline therapy on human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1983a; 10: 590-601.
29. Lindhe J, Liljenberg B. Adielsson B, & Borjesson I. Use of metronidazole as a probe in the study of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1983b; 10: 100-112.
30. Lovegrove JM. Dental plaque revisited: Bacteria associated with periodontal disease. *J N Z Soc Periodontol.* 2004; 87: 7-21.
31. Martin EF, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative Microbiological Study of Human Carious Dentine by Culture and Real-Time PCR: Association of Anaerobes with Histopathological Changes in Chronic Pulpitis. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1698–704.
32. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site Specific Development of Periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and

- Tannerella forsythia* in subgingival plaque. J Periodontol. 2008; 79: 670-676.
33. Muhlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding-a leading symptom in initial gingivitis. Helv Odontolol Acta. 1971; 107-113.
34. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001; 183: 3770-83.
35. Persson GR, Hitti J, Paul K, Hirschi R, Weibel M, Rothen M, et al. *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in Subgingival Bacterial Samples From Parous Women. J Periodontol. 2008; 79: 508-16.
36. Pihlstrom BL, McHugh RB, Oliphant TH, Ortiz-Campos C. Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 61/2 years. J Clin Periodontol. 1983; 10: 524-41.
37. Ramfjord SP, Caffesse RG, Morrison EC, Hill RW, Kerry GJ, Appleberry EA, et al. Four modalities of periodontal treatment compared over five years. J Periodontal Res. 1987; 22: 222-32.
38. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone X083 in primary endodontic infections. J Endod. 2009; 35: 1359-62.
39. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Molecular analysis of endodontic infections. Endodontic microbial. 2009: 68-107.
40. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Thesis. Umea: Umea University. Odontological Dissertations. 1976; 7.
41. Tran T, Flynn MJ, Chen C, Slots J. *Porphyromonas endodontalis* in subgingival plaque. Clin Infect Dis. 1997; 25: 222-3.

42. Uematsu H, Sato N, Hossain MZ, Ikeda T, Hoshino E. Degradation of arginine and other amino acids by utyrate-producing asaccharolytic anaerobic Gram-positive rods in periodontal pockets. *Arch Oral Biol.* 2003; 48: 423–29.
43. Van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black- pigmented acteroides species in odonto- genic abscesses. *Infect Immun.* 1985; 49: 494–49
44. Van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA & van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Perodontol.* 2002; 29: 1023-1028.
45. Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M.. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 341-6.
46. Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 1942-6.
47. Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol.* 2004; 75: 1077-83.

Considerações finais

Evidências na literatura demonstram a importância de métodos diagnósticos na identificação de periodontopatógenos presentes no fluido crevicular.

Alguns autores demonstraram a grande atenção que tem sido dada ao desenvolvimento e aplicação de técnicas específicas, com o objetivo de contribuir na identificação, caracterização de periodontopatógenos, no conhecimento sobre suas interações microbianas e a relação com os fatores clínicos da doença periodontal^{5, 25, 28}.

Tal fato justifica o interesse do presente estudo em realizar uma revisão da literatura para comparar as técnicas de cultura bacteriana e PCR em tempo real na identificação e quantificação dos principais periodontopatógenos.

No capítulo 1 foi demonstrado que o PCR em tempo real mostrou ser uma ferramenta mais sensível e específica na detecção de periodontopatógenos, a qual consegue identificar e quantificar micro-organismos em baixas concentrações. Espécies bacterianas viáveis e não viáveis, de difícil cultivo ou não cultiváveis são sensíveis ao método de PCR em tempo real. Entretanto se bem indicada, a técnica de cultura bacteriana pode mostrar resultados interessantes, até mesmo por ser o único método capaz de identificar novas espécies.

Baseado nestes dados pode-se concluir que métodos de biologia molecular são ferramentas de grande valia no diagnóstico microbiológico.

O PCR convencional apesar de ser uma técnica sensível e específica não permite uma quantificação absoluta do número exato de micro-organismos presentes levando muitas vezes a resultados errôneos. Como demonstrado por Socransky et al.⁴⁹ (1999), é necessário a presença de micro-organismos no fluido gengival porém não essencial para o desenvolvimento da doença periodontal. Assim a correta quantificação do número de espécies bacterianas presentes no fluido gengival permite distinguir entre sítios com baixas e altas quantidades de

periodontopatógenos. Estes resultados associados aos dados clínicos permitiu diferenciar sítios saudáveis e doentes de um indivíduo^{25,49}.

Tal fato justifica os estudos demonstrados no capítulo 2 no qual comparou-se as técnicas de PCR e PCR em tempo real na identificação de *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *T. forsythia* em sítios saudáveis e doentes de pacientes com periodontite crônica antes e 60 dias após o tratamento periodontal básico.

Pode-se observar que ambas as técnicas foram capazes de identificar estes patógenos. Porém o PCR em tempo real mostrou ser mais sensível e específico, por conseguir identificar espécies bacterianas que se apresentavam em baixas concentrações. Com isso o PCR em tempo real mostrou ser mais efetivo no diagnóstico microbiológico por permitir uma quantificação exata e assim diferenciar a quantidade de micro-organismos presentes em sítios saudáveis e doentes de um indivíduo.

Através destas técnicas de biologia molecular pode-se identificar uma variedade de micro-organismos presentes na doença periodontal, até mesmo algumas pouco descritas na literatura como o caso do *Porphyromonas endodontalis*. No capítulo três foi realizado um estudo clínico e microbiológico de PCR e PCR em tempo real para avaliar a presença deste patógeno no fluido gengival de sítios doentes e saudáveis de pacientes com periodontite crônica e sua relação com dois periodontopatógenos já consagrados (*P. gingivalis* e *T. forsythia*), bem como avaliar o efeito do tratamento periodontal básico de raspagem e alisamento radicular e instrução de higiene oral na diminuição destes patógenos.

Pode-se observar que os três patógenos foram detectados em concentrações semelhantes com maior frequência nos sítios doentes quando comparados aos sítios saudáveis. O tratamento periodontal básico foi capaz de diminuir a incidência de todos os patógenos. Com isso sugere-se que o *P. endodontalis* possa influenciar na etiologia e progressão da doença periodontal. Estes estudos corroboram com os achados de Kumar et al.²⁴ (2003) e Dahlen, Lenhardt¹¹ (2006), os quais mostraram alta concentração de *P. endodontalis* em

sítios periodontalmente doentes quando comparados a sítios saudáveis, concluindo que este patógeno pode influenciar na progressão da doença periodontal ^{11,24}.

Conclusão

De acordo com os limites do presente estudo, a técnica de PCR em tempo real mostrou ser um método de diagnóstico sensível e específico na identificação do *Porphyromonas endodontalis* e outros periodontopatógenos. Devido a alta detecção de *Porphyromonas endodontalis*, sugere-se que este patógeno possui papel importante na etiologia e progressão da doença periodontal.

Referências*

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5721-32.
2. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25: 229-35.
3. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6.
4. Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 3334-40.
5. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11: 266-73.
6. Barbosa e Silva E, Peruchi CMS, Toledo BEC. Bases clínicas e biológicas do estágio atual da terapia periodontal mecânica. *RPE. Revista Inter Period Clín.* 2006; 3: 89-99.
7. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandembroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 45: 191-9.
8. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2007; 78: 79-86.
9. Bustin SA. Absolute quantification mRNA using real-time reverse polymerase chain reaction assays. *J Molec Endocrinol.* 2000; 25: 169-93.

*De acordo com o estilo Vancouver

Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

10. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1553-8.
11. Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 6-11.
12. Dymock D, Weightman AJ, Scully C, Wade WG. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 537-42.
13. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 638-44.
14. Feres M, Figueiredo LC. Current concepts in the microbial etiology and treatment of chronic periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* 2009; 11: 234-49.
15. Guillot E, Mouton C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia sensu stricto* and *Prevotella nigrescens*. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1876-82.
16. Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 84-91.
17. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1994; 5: 78–111.
18. Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis.* 2004; 10: 106-12.

19. Jervøe-Storm PM, Alahdab H, Koltzsch M, Fimmers R, Jepsen S. Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as analyzed by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2007; 78: 909-17.
20. Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 778-83.
21. Klein MI, Gonçalves RB. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. *J Periodontol.* 2003; 74: 798-802.
22. Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulske-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect.* 2006; 8: 687-93.
23. Kuboniwa M, Amana A, Shizukuishi S. Hemoglobin-binding protein purified from *Porphyromonas gingivalis* is identical to lysine-specific cysteine proteinase(Lysgingipain). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249: 38-43.
24. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003; 82: 338-44.
25. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva. A Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *T. forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 1061-9.

26. Lavanchy DL, Bickel M, Baehni PC. The effect of plaque control after scaling and root planning on the subgingival microflora in human periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1987; 14: 295-9.
27. Listgarten MA., Lindhe J, Hellden L. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal on human periodontal disease. Clinical, microbiological and histological observations. *J Clin Periodontol.* 1978; 5: 246-71.
28. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, van Poperin N, Hujoel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 418-26.
29. Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *P. gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2362-65.
30. Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Alves GB, Hirata R Jr, Andrade AF. Detection of *P. endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *J Endod.* 2000; 16: 729-32.
31. Malheiros VJ, Avila-Campos MJ. Detection of pathogens from periodontal lesions. *Rev Saude Publica.* 2004; 38: 723-8.
32. Martin EF, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative Microbiological Study of Human Carious Dentine by Culture and Real-Time PCR: Association of Anaerobes with Histopathological Changes in Chronic Pulpitis *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1698–704.
33. McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumonia* using real-time fluorescence. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3446-51.
34. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site-Specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *P. gingivalis*, *T.denticola*, and *T.a forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol.* 2008; 79: 670-76.

35. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994; 5: 66-77.
36. Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Meths*. 2004; 59: 117-25.
37. Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol*. 2005; 76: 1542-9.
38. Offenbacher S, Katz V, Fertik G, Collins J, Boyd D, Maynor G, et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*. 1996; 67: 1103-13.
39. Papapanou PN. Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol*. 2002; 7: 54-61.
40. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001; 183: 3770-83.
41. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and oral sites. *Periodontol 2000*. 2006; 42: 80-7.
42. Pedrazzoli V, Kilian M, Karring T, Kirkegaard E. Effect of surgical and non surgical periodontal treatment periodontal status and subgingiva microbiota. *J Clin Perodontol* 1991; 18: 598-604.
43. Petit MD, van Winkelhoff AJ, van Steenbergen TJ, de Graaff J. *Porphyromonas endodontalis*: prevalence and distribution of restriction enzyme patterns in families. *Oral Microbiol Immunol*. 1993; 8: 219-24.

44. Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for *B. forsythus*, *P. gingivalis*, and *A. actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 2003; 38: 465-70.
45. Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE.. *T.denticola* and *P. gingivalis* as prognostic marks following periodontal treatment. *J Periodontol.* 1992; 63: 270-73.
46. Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis* 2003; 9: 54-62.
47. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1979; 6: 351-82.
48. Slots J, Ting M. *A. actinomycetemcomitans* and *P.gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000.* 1999; 20: 82-121.
49. Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Feres M, Mager D. Ecological consideration in the treatment of *A. actinomycetemcomitans* and *P.gingivalis* periodontal infections. *Periodontol 2000.* 1999; 20: 341-62.
50. Tsarev VN, Nikolaeva EN, Nosik AS. Use of molecular genetic systems for diagnostics of inflammatory diseases of oral mucosa and periodontium. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2000; 7: 69-73.
51. Tran T, Flynn MJ, Chen C, Slots J. *Porphyromonas endodontalis* in subgingival plaque. *Clin Infect Dis.* 1997; 25: 222-3.
52. Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21: 341-6.
53. Zambon JJ. Periodontal diseases: Microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 879-925.

54. Zijngel V, Harmsen HJM, Kleinfelder JW, van der Rest ME, Degener JE, Welling GW. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to study bacterial community structure in pockets of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 59-65.
55. Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 1942-6.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Comitê de Ética em Pesquisa

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "EFEITO DA TERAPIA PERIODONTAL NA MICROBIOTA SUBGENGIVAL PARÂMETROS CLÍNICOS E MICROBIOLÓGICOS COMPARATIVOS DE PCR SEMI QUANTITATIVO E PCR EM TEMPO REAL", sob o protocolo nº 26/08, de responsabilidade do Pesquisador (a) **DENISE MADALENA CALOMARI SPOLIDÓRIO**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 03 (três) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "EFFECT OF THE PERIODONTAL THERAPY IN SUBGENGIVAL MICROBIOTA CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL PARAMETERS BY PCR AND REAL TIME PCR", protocol number 26/08, under Dr. **DENISE MADALENA CALOMARI SPOLIDÓRIO**, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 03 (three) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 08 de setembro de 2008.

Prof. Dr. Mirian Aparecida Onofre
Coordenadora

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular, declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu (nome completo) _____, (nacionalidade) _____, (profissão) _____, portador do R.G. _____, IDADE _____, residente à Rua/Av _____, na cidade de _____, Estado de _____, N° do prontuário: _____ concordo em participar da pesquisa intitulada "Efeito da terapia periodontal na microbiota subgingival. Parâmetros clínicos e microbiológicos comparativos de PCR semi quantitativo e PCR em tempo real." e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não me restarem dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- 1- Esta pesquisa tem por objetivo verificar o resultado do tratamento da inflamação da gengiva (gingivite) e raiz do dente (doença chamada de periodontite), através de exames clínicos e exames de laboratório. Nessa pesquisa, inicialmente, será feito um questionário de saúde geral e seus hábitos de higiene bucal, será realizado exame clínico de rotina dos dentes (avaliação da presença de lesões de cárie e restaurações) e da gengiva. Os possíveis desconfortos relacionados a essa seleção são aqueles decorrentes de um exame de rotina e do tratamento da gengiva. Serão tomadas todas as medidas para garantir que o exame e o tratamento sejam seguros, tais como uso de materiais descartáveis e de instrumentais esterilizados.
- 2- Após esses primeiros exames, poderei ser ou não selecionado para o estudo. Se não for selecionado, os benefícios associados a minha participação nesse exame são o acesso a um diagnóstico preciso da minha condição bucal, bem como esclarecimento e encaminhamento para tratamento, de acordo com minhas necessidades. Se for selecionado, e tendo aceito participar como voluntário, será marcada nova data a ser agendada pelo pesquisador responsável, para a realização de um exame radiográfico (radiografias) de todos os dentes, e coleta de amostras do fluido do sulco gengival (líquido presente entre a gengiva e o dente) para avaliação da infecção presente (microbiológico). Esses exames são absolutamente seguros e comum aos tratamentos de gengiva. Fica, ainda, assegurado o direito ao sigilo de todos os dados coletados, dos participantes selecionados ou não, sendo que, em nenhum momento, será permitido acesso de outra pessoa a esses dados, além do pesquisador ou do próprio indivíduo.
- 3- A partir do início do estudo, serei chamado a comparecer semanalmente, com horário agendado, por 3 meses, à clínica de periodontia (tratamento de gengiva e da raiz do dente)

IDENTIFICAD Nº 26/08
Aprovação em Reunião de
05/09/07

para receber os exames e tratamento de gengiva e periodonto necessários, bem como o acompanhamento adequado. O tratamento a ser realizado é conhecido, seguro e faz parte de todos os tratamentos de gengiva já existentes. Faz-se uma raspagem dos dentes e da raiz do dente (remoção do tártaro), o qual poderá ser realizado sob anestesia local quando se fizer necessário, polimento e instrução de higiene oral.

- 4- Essa raspagem visa deixar os dentes e a raiz mais lisos, facilitando a minha escovação, e diminuindo a inflamação da gengiva. Poderei apresentar alguma sensibilidade dos dentes após esta raspagem, o que é uma consequência de qualquer tratamento da gengiva, não sendo um resultado específico do tratamento que irei receber. Caso relate essa sensibilidade será feita uma aplicação tópica de um gel para diminuir a minha sensibilidade chamado de dessensibilizante.
- 5- Em todas as visitas será tomado o cuidado com o meu controle de placa(limpeza da boca) para a garantia da minha saúde gengival. A periodontite, se não for tratada, pode levar a perda dos dentes.
- 6- Estou ciente de que os riscos frente aos procedimentos aos quais serei submetido estão relacionados à utilização de anestésicos locais de rotina no atendimento odontológico. Complicações relacionadas ao uso de anestésicos serão evitadas pela avaliação de história anterior de reações alérgicas a algum tipo de anestésico ou alterações na pressão arterial. Caso seja informada alguma alteração, serei encaminhado para avaliação médica e somente poderei participar do estudo quando houver autorização do profissional. Quanto à realização de radiografias e os riscos de exposição à radiação, usarei avental e colar de chumbo como medida de proteção, o exame será realizado dentro da quantidade de radiação permitida e por técnico capacitado, o que evitará as tomadas repetidas e desnecessárias.
- 7- Os conhecimentos adquiridos, com o presente estudo, serão importantes, futuramente, para a prevenção e tratamento das doenças de gengiva, pois poderão contribuir para que melhores diagnósticos da gengivite e periodontite sejam desenvolvidos. É importante ressaltar que toda e qualquer dúvida em relação a esse estudo será esclarecido pelo pesquisador responsável e que poderei requisitar esse esclarecimento a qualquer momento.
- 8- Fui esclarecido que não terei gastos extras, a não ser o deslocamento, e que meu consentimento não tira a responsabilidade dos profissionais que estão realizando esta pesquisa.
- 9- Estou ciente que minha participação é voluntária e tenho plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhum tipo de penalização no atendimento a que necessito.

Protocolo CEP N° 026/07
Aprovado em Reunião de
05/09/07
— F —

10-Autorizo, para os devidos fins, o uso, a divulgação e publicação em revistas científicas, brasileiras ou estrangeiras, dos dados obtidos na pesquisa. Recebi a garantia de que a minha identidade não será divulgada, assegurando a minha privacidade.

Caso haja qualquer problema ou dúvida durante minha participação na pesquisa, terei plena liberdade de contactar :

Telma Blanca Lombardo Bedran: (16) 3335-9559/ (016) 9245-4733

Comitê de Ética em Pesquisa: (16) 3301-6432/6434.

Por esse instrumento particular, declaro, para fins de Ética e Legislação em Pesquisa, que eu,

Nascido (a) em ____/____/____, portador do RG _____ (Órgão
Expedidor _____), residente à

Nº _____,
Bairro _____, cidade _____, Estado _____, que li e
entendi as informações acima citadas e concordo em participar da pesquisa "Efeito da terapia
periodontal na microbiota subgengival. Parâmetros clínicos e microbiológicos comparativos de
PCR semi quantitativo e PCR em tempo real." recebendo os exames (para análise clínica e
microbiológica) e tratamento especificados.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário: _____.

Assinatura do pesquisador: _____.

Protocolo CEP N° 26/07
Aprovado em Reunião de
05/09/07

Anexos

Anexo 3: Material e Métodos

Cálculo da amostra

O cálculo da amostra foi baseado nos dados publicados em estudo prévio recente que utilizaram técnica de PCR em tempo real na detecção de patógenos^{19,52}. Foi considerado o poder do teste de 90% nível de significância de 5% e a diferença a ser detectada de 1,5mm e como parâmetro, a profundidade de sondagem. A diferença padronizada do poder de estudo em 0,95 ($1-\beta=0,95$) e um intervalo de confiança $\alpha=0,05$ determinou uma amostra de pelo menos 17 pacientes para receber o tratamento.

Perfil da amostra

A amostragem envolveu o recrutamento de pacientes que procuraram a Clínica de Periodontia do curso de pós-graduação em Odontologia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Foram selecionados 20 pacientes com idade entre 35 e 55 anos que apresentavam doença periodontal crônica moderada ou severa generalizada segundo os critérios estabelecidos pela Academia Americana de Periodontia³(1999).

Cada voluntário recebeu as informações a respeito da pesquisa, seus objetivos, importância e benefícios. A adesão do paciente à pesquisa ocorreu de forma espontânea com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (protocolo nº 26/08-Anexo 1) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Critérios de inclusão:

- Apresentar boas condições de saúde geral, sem qualquer alteração sistêmica evidente ao exame clínico ou detectado na anamnese;
- Possuir idade entre 35 e 55 anos;

- História negativa de discrasias sanguíneas ou disfunções hepáticas, renais, pulmonares e cardíacas (inclusive transplantados);
- História negativa de estado gestacional e/ou uso de contraceptivos ou qualquer outro tipo de hormônio nos últimos 4 meses antecedentes ao estudo ou durante o mesmo;
- História negativa de antibioticoterapia nos últimos 6 meses ou durante o mesmo;
- História negativa de anti-inflamatórios esteróides ou não-esteróides nos últimos 3 meses, ou durante o mesmo seja na forma sistêmica ou local;
- Não estar fazendo uso de nenhum anti-séptico bucal durante o estudo ou nos últimos 3 meses;
- Não ter utilizado medicação imunossupressora nos últimos 6 meses;
- História negativa de fumo;
- Não ter se submetido a qualquer tipo de tratamento odontológico nos últimos 6 meses;
- Ausência de quadros periodontais agudos no momento do exame (abscessos periodontais e gengivite e/ou periodontite necrosante aguda);
- Apresentar pelo menos 20 dentes;
- Apresentar pelo menos 3 sítios periodontais não vizinhos com perda de inserção maior ou igual a 3mm e profundidade de sondagem maior ou igual a 5 mm e presença de sangramento a sondagem;
- Apresentar pelo menos 2 sítios saudáveis não vizinhos com profundidade de sondagem menor ou igual a 3 mm, e ausência de sangramento a sondagem os quais servirão como controle negativo.

Calibração do Examinador

Para calibrar o examinador do estudo, 180 sítios apresentando profundidade de sondagem ≥ 5 mm foram selecionados aleatoriamente em 10 pacientes (18 sítios por paciente em dentes multi e uni-radiculares). O examinador mensurou a profundidade da bolsa periodontal em 2 ocasiões, em um intervalo de 7 dias. Os dados foram submetidos a análise de concordância Kappa e obteve o

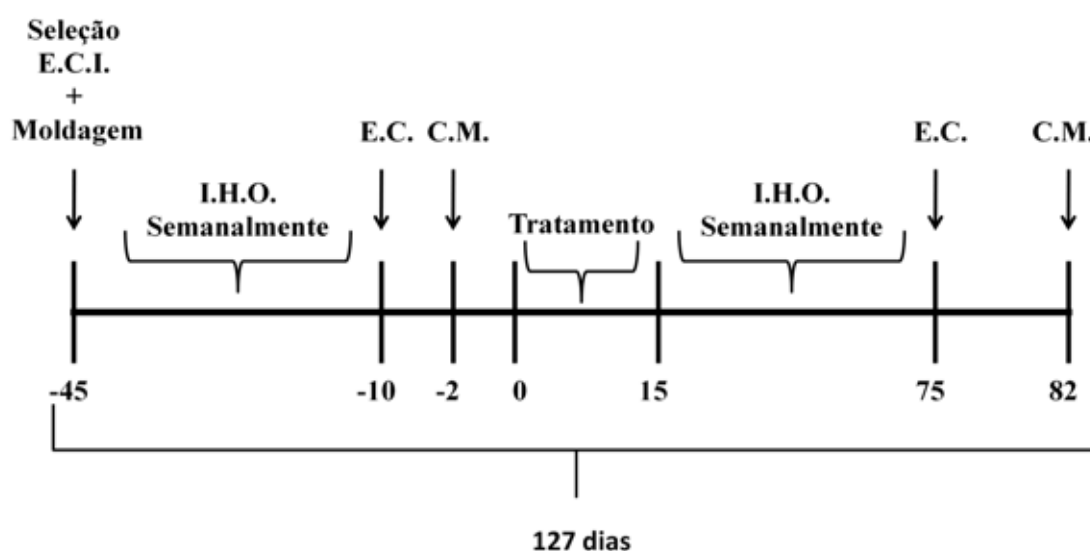
valor de 0,915 com um intervalo de 95% de confiança. Portanto não houve diferenças estatisticamente significantes entre os exames e por isso o examinador foi considerado calibrado.

Delineamento clínico do estudo

Cronograma de Execução da Metodologia

O cronograma de execução da metodologia do presente estudo está ilustrado no Quadro 1.

Quadro 1: Cronograma de estudo **Legenda:** **E.C.I.:** Exame Clínico Inicial; **I.H.O.:** Instrução de Higiene Oral; **E.C.:** Exame Clínico; **C.M.:** Coleta Microbiológica



Procedimentos iniciais

Antecedendo o início do estudo (45 dias antes), foi realizada a seleção dos pacientes de acordo com os critérios de inclusão citados anteriormente e moldagens das arcadas dentais em alginato que incluíram os dentes selecionados para o estudo. Essas moldagens foram, então, vazadas em gesso-pedra e, sobre esses modelos, foram confeccionados guias, utilizando-se placas de polipropileno de 1,0 mm de espessura, prensadas em aparelho a vácuo (Bio-Art[®] Equipamentos

Odontológicos, São Paulo/SP – Brasil)(Fig.1). O uso desses guias teve por finalidade padronizar o posicionamento da sonda periodontal durante a realização do exame de profundidade de sondagem e nível de inserção, assim como no auxílio da coleta do fluido crevicular.

Em seguida os pacientes receberam instrução de higiene oral semanalmente durante 30 dias para utilização de escova dental pela técnica de Bass, fio dental e outros meios complementares (escova interdental, escova de língua, etc) de acordo com as necessidades individuais de cada um. Após 30 dias de instrução de higiene oral, foi realizado o exame periodontal.

Exame clínico

Dez dias antes do baseline, todos os pacientes foram submetidos ao exame periodontal completo, realizado por um único examinador treinado e previamente calibrado e cego para o momento do estudo (Kappa ponderado =0,91). O exame clínico foi realizado com o uso de sonda periodontal milimetrado tipo Willians® (Fig.2)

O exame periodontal completo consistiu de índice de placa visível, índice de sangramento marginal, sangramento à sondagem, mensuração da profundidade de sondagem, posição da margem gengival e nível clínico de inserção. Este exame foi realizado em seis pontos por dente.

As medidas foram anotadas em ficha própria e guardadas em banco de dados para posterior análise.



FIGURA 1: Confecção das placas de poliacrileno. **FIGURA 2:** Exame periodontal com o auxílio das placas de poliacrileno.

Exame Periodontal:

Índice de placa visível:(IP) presença ou ausência de placa bacteriana visível a olho nú, após secagem da superfície dentária com jato de ar, em todas as faces de todos os dentes².

Índice de sangramento marginal:(ISM) presença ou ausência de sangramento marginal verificado após inserção de uma sonda periodontal milimetrada no sulco gengival, com inclinação de 60 graus em relação ao dente, percorrendo o espaço do sulco de uma proximal a outra, em todas as faces de todos os dentes².

Posição da margem gengival(Recessão Gengival):(RG) distância da margem gengival à junção cimento-esmalte.

Mensuração da profundidade de sondagem:(PS) distância da margem gengival ao fundo do sulco gengival, mensurada com sonda periodontal milimetrada em 6 sítios por dente: disto-vestibular, vestibular, mesio-vestibular, disto-lingual, lingual e distolingual.

Sangramento à sondagem:(SS) presença ou ausência de sangramento, decorrido um tempo de 30 segundos após a mensuração da profundidade de sondagem.

Avaliação do nível de inserção clínico:(NIC) corresponde à somatória das medidas da posição da margem gengival e profundidade de sondagem, para cada sítio, de cada elemento dentário.

Para seleção dos dentes para coleta do fluido crevicular em caso de mais de dois sítios doentes e sadios foi padronizado a escolha de sítios superiores posteriores não vizinhos para os sítios doentes e superiores anteriores não vizinhos para os sítios sadios.

Foram selecionados por paciente, dois sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 5 mm com sangramento a sondagem e perda de inserção maior ou igual a 3 mm e dois sítios sadios com ausência de perda de inserção e sem sangramento a sondagem e profundidade de sondagem menor ou igual 3 mm. Esses dentes que foram selecionados não apresentavam qualquer disfunção em relação à oclusão, e não utilizavam próteses.

Coleta do fluido crevicular

Após 1 semana da realização do exame clínico, o biofilme bacteriano supragengival foi removido com o auxílio de gaze estéril, lavado e a área isolada com rolo de algodão. Dois cones de papel (nº30) estéril (inicialmente inseriu-se o primeiro cone e após 1 minuto de sua remoção foi inserido o segundo cone) foram introduzidos no sulco ou bolsa gengival até a porção mais apical (portanto 4 sítios por paciente 2 sadios e 2 doentes) por 30 segundos (Fig 3). Após a remoção dos cones, estes foram colocados em tubos tipo eppendorf estéril contendo 500 uL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) e congelados à -20°C até a extração do DNA para análise microbiológica por PCR em tempo real e PCR semi quantitativo (Fig 4).



FIGURA 3: Coleta do fluido crevicular com cone de papel.



FIGURA 4: Introdução do cone de papel em solução tampão.

Tratamento Periodontal Básico

Após a coleta microbiológica, foi instituído o tratamento periodontal básico, que foi realizado em um período de quinze dias. Os pacientes foram submetidos aos procedimentos de raspagem supra e subgengival de toda a arcada dentária, sendo dois quadrantes por semana, sob anestesia local e instrumentação manual com curetas Universal tipo McCall[®], limas foices, e curetas específicas tipo Gracey[®] com duração de 45 a 60 minutos por quadrante. O polimento foi executado imediatamente após a RAR com taça de borracha macia montada em

motor de baixa rotação e pasta profilática de granulação fina na região raspada em cada sessão. Os pacientes também foram instruídos e motivados quanto à higienização bucal correta por meio de ensino da técnica de escovação (método de Bass) e fio dental. O tratamento foi realizado pelo profissional especialista em Periodontia diferente do examinador e cego para o grupo de estudo, e estava completo em aproximadamente 2 semanas. Foi realizado ainda o controle do biofilme supragengival (fase de manutenção) e instrução de higiene oral semanalmente durante 60 dias, até que se realizasse a segunda coleta do fluido crevicular.

Após os dois meses do término do procedimento de raspagem e alisamento radicular, todos os pacientes foram reavaliados clinicamente, incluindo todas as variáveis do exame clínico inicial e após uma semana novas coletas de fluido sulcular gengival foram coletadas para a avaliação do efeito do tratamento periodontal básico não-cirúrgico.

Análise microbiológicas

Bactérias e cultivo das espécies

Os micro-organismos utilizados foram cultivados em câmara de anaerobiose a 37°C com 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ (Fig 5) a partir de amostras puras de cada bactéria, gentilmente doados pela Profa. Dra. Márcia P. Meyer (Instituto de Ciências Biológicas(ICB) – Universidade de São Paulo- USP) e Prof. Dr. Daniel Grenier (Group de recherche en écologie buccale(GREB)-Faculté de Médecine dentaire-Université of Laval) para servirem como amostras padrão em comparação as amostras obtidas dos pacientes.



FIGURA 5: Câmara de Anaerobiose

As bactérias utilizadas *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Tanerella forsythia* (ATCC 43037) e *Porphyromonas endodontalis* (E203) foram cultivadas em placas contendo Tryptic soy broth (TSB) suplementado (0,0001% extrato de levedura, 0,001% hemina menadiona, ágar e sangue) ²¹. Após o crescimento bacteriano, cada micro-organismo foi transferido para tubos com 5ml TSB caldo e foram incubados novamente com um tempo que variava de acordo com as exigências fisiológicas de cada micro-organismo para seu crescimento. Após o crescimento, o material resultante teve sua turbidez ajustada com o auxílio do espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 – Thermo Electron Corporation) a 260 nm, e a relação entre as absorvâncias a 260/280 nm foi analisada. Posteriormente, foram realizadas 10 diluições seriadas em solução salina de cada micro-organismo e semeadas em placas de cultura para determinação do valor de UFC/mL. Após o crescimento e contagem de UFC/mL, os micro-organismos foram coletados, lavados, centrifugados e congelados a -20°C para posterior extração de DNA.

Extração de DNA:

Os *eppendorfs* foram descongelados e agitados em vortex (Phoenix AP 56, Araraquara, SP, Brasil) por 1 minuto. Foi retirada uma alíquota de 100 microlitros (μ L) de cada amostra e estas foram mantidas em banho seco (Thermomixer

Comfort, Eppendorf Ag 22331, Hamburg, Alemanha) a 97°C por 10 minutos. Cem microlitros de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 1 mM EDTA, pH 8,0) foram adicionados aos *eppendorfs* e, em seguida, foram acrescentados 200 µL de Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram homogeneizadas em vortex duas vezes por 1 minuto cada e centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro *eppendorf* e esta etapa foi repetida por mais duas vezes. Os *eppendorfs* foram acrescidos de 25 µL de NaCl 5M, em seguida foram preenchidos com etanol absoluto gelado e homogeneizados manualmente por 20 vezes suavemente. Os *eppendorfs* foram levados ao freezer -20°C por 20 minutos. Após este período, as amostras foram, novamente, centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e descartado, deixando somente o *pellet* correspondente ao DNA. Os *pellets* foram lavados 2 vezes com 1mL de etanol 75% gelado, homogeneizados manualmente por 20 vezes suavemente. O etanol foi descartado e os *eppendorfs* foram deixados à temperatura ambiente (24±1°C) até a sua completa evaporação. Após seco, o precipitado foi ressuspensionado em 70 µL de TE. A concentração de DNA foi determinada com espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 – Thermo Electron Corporation) a 260 nm, e a relação entre as absorvâncias a 260/280 nm foi analisada. Como parâmetro de qualidade, foi considerada como adequada entre 1,8-2,0.

Reação da polimerase em cadeia do tipo semi quantitativo – PCR (seleção dos oligonucleotídeos)

Para análise microbiológica foi utilizada a reação de polimerase em cadeia (PCR) semi quantitativo, para identificar a presença das seguintes bactérias: *P. gingivalis* (*Pg*), *P. endodontalis* (*Pe*) e *T. forsythia* (*Tf*).

Essa técnica baseia-se em reações enzimáticas cíclicas de desnaturação pelo calor, hibridização dos oligonucleotídeos e síntese enzimática de DNA desejado, permitindo a identificação de sequências de genes específicos, tais como genes de espécies bacterianas.

Os pares de oligonucleotídeos (5' – 3'), ou seja, os primers específicos para cada bactéria foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo – SP (Invitrogen Tech-LineSM). As sequências utilizadas para as bactérias estão descritas na Tabela 1.

Inicialmente a presença de DNA nas amostras obtidas dos pacientes foram confirmadas através de reação de polimerase em cadeia (PCR), realizada em termociclador convencional (MyCyclerTM thermal cycler - BioRad) utilizando oligonucleotídeos inespecíficos (Wilson et al.⁵⁵ 1990).

PC3mod = 5' GGACTAHAGGGTATCTAAT 3'

POmod = 5' AGAGTTTGATCMTGG 3'

As amostras positivas para a reação inespecífica foram, então, processadas em reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos (Tabela 1).

Reação da polimerase em cadeia do tipo semi quantitativo (PCR)

Os oligonucleotídeos foram dissolvidos em solução estéril contendo Tris HCl (10mM – pH 7,6) e EDTA (1mM – pH 8,0) em volume calculado para concentração final de 25µM.

As reações de PCR foram realizadas em tubos específicos e otimizadas para cada oligonucleotídeo específico utilizado. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25µL, contendo 1mM de cada oligonucleotídeo da bactéria específica (Invitrogen Tech-LineSM), 100 µM de dNTPs (Invitrogen Tech-LineSM) 1 a 2,5mM de Mg²⁺ e, de 1 a 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Tech-LineSM). Os tubos com as amostras foram submetidas ao Vortex por 10 segundos para homogeneização da solução e, em seguida, foi obtida uma alíquota de 2µL. Todas as reações foram realizadas na presença de controle positivo, contendo DNA genômico específico da bactéria em análise, e controle negativo, sem DNA molde (Tabela 2).

Tabela 1. Oligonucleotídeos para a identificação pela técnica de PCR convencional

Bactéria	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado	Referências
<i>P.gingivalis</i>	5' AAT CGT AAC GGG CGA CAC AC 3' 5' GGG TTG CTC CTT CAT CAC AC 3'	593 pb	Ashimoto et al. ⁵ (1996)
<i>T. forsythia</i>	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	641 pb	Ashimoto et al. ⁵ (1996)
<i>P. endodontalis</i>	5' GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC 3' 5' CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC 3'	672 pb	Trung Tran, et al. ⁵⁰ (1997)

Tabela 2. Condições de termociclagem e otimização de cada par de *primer*

<i>Primer</i>	Condição da reação	Concentração de Mg ²⁺	Unidades de Taq
<i>Primer inespecífico</i>	95 °C, 5min (1 ciclo); 96 °C, 30 seg, 45 °C, 30seg, 72 °C, 30seg (30 ciclos)	2,5mM	1U
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	2,5mM	1U
<i>Tannerella forsythia</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 95 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 1min. (36 ciclos)	1,5mM	1,25U
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	95 °C, 2min. (1 ciclo); 94 °C, 30 seg, 60 °C, 1min., 72 °C, 2min. (36 ciclos)	1,5mM	1,25U

Eletroforese

A presença do DNA amplificado foi observada em eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparados com agarose ultrapura (Invitrogen Tech-LineSM) em solução tamponada TBE 1X (Tris 1M; ácido bórico 0,9M; EDTA 0,5M) e acrescido de 0,5 uL do corante de brometo de etídio (Invitrogen Tech-LineSM).

Para a corrida eletroforética horizontal foi utilizado o sistema Horizon 11.14 (Life Technologies). Foram utilizados 12µL do produto da reação de PCR e 3 µL de tampão de amostra (Invitrogen Tech-LineSM) para aplicação no gel e este foi submetido a uma corrente elétrica contínua de 100V por 90 minutos. As bandas presentes no gel foram observadas imediatamente com o auxílio de um transluminador de luz ultravioleta e a seguir foi obtida imagem digitalizada do gel para documentação e análise (Image Quant 100 – GE Healthcare). As fotografias obtidas foram armazenadas para posterior análise da presença das bactérias investigadas.

Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)

Esse teste teve como objetivo detectar, quantitativamente, as seguintes bactérias: *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *P. Endodontalis*, para posterior comparação com a técnica de PCR convencional

Seleção dos oligonucleotídeos

Os *primers* específicos para cada micro-organismo foram sintetizados pela Applied Biosystems[®] (Tabela 2). Todos os *primers* foram analisados quanto a sua especificidade através da verificação da curva de Melting (obtida depois de corrida no LightCycler) e eletroforese em gel para verificação dos produtos.

Tabela 3: Primers específicos para detecção das espécies pela técnica de PCR em tempo real

Bactéria	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado	Temperatura de Dissociação	Referências
<i>P.gingivalis</i>	5' ACC TTA CCC GGG ATT GAA ATG 3' 5' CAA CCA TGC AGC ACC TAC ATA GAA 3'	83 pb	77,09 °C	Kuboniwa et al. ²³ (2004)
<i>T. forsythia</i>	5' AGC GAT GGT AGC AAT ACC TGT C 3' 5' TTC GCC GGG TTA TCC CTC 3'	88 pb	82,32°C	Kuboniwa et al. ²³ (2004)
<i>P.endodontalis</i>	5'- GCT GCA GCT CAA CTG TAG TCT TG -3' 5'-TCA GTG TCA GAC GGA GCC TAG TAC-3'	110 pb	80,24°C	Martin et al. ³² (2002)

A utilização do SYBR Green exige a obtenção de produtos específicos de PCR e em função disso a eficácia das reações para *primers* foi otimizada anteriormente ao início das reações propriamente ditas. Concentrações variando de 2 a 5 mM de MgCl₂ e de 0,2 a 0,5 µM de cada *primer* foram utilizados para se determinar em quais condições a reação teria a melhor eficiência. Condições essas sugeridas pelo fabricante do equipamento.

Cada placa continha 2 amostras com ausência de DNA como controle negativo e quatro amostras em diferentes concentrações a partir do DNA das bactérias puras que serviu para confecção da curva padrão. Para realização da curva padrão primeiramente foi utilizado o DNA extraído a partir da bactéria pura, onde foi feita a leitura em espectrofotômetro de luz UV (Biomate 3 – Thermo Electron Corporation) por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280 nm. Para calcular a concentração de cada bactéria obteve-se uma concentração inicial entre 0,5 - 0,6 µg/uL de cada DNA bacteriano. Em seguida realizou-se 8 diluições seriadas e após otimização foram selecionadas apenas 4 diluições por placa (10⁴ - 10⁷) para confecção da curva padrão.

A curva padrão(a qual possuía concentração conhecida) foi utilizada para converter os score de Ct(Cycle Treshold) obtidos com as amostras de fluido em um números exatos de concentração de DNA.

Reações PCR em tempo real (PCR-RT)

As reações do PCR quantitativo foram realizadas utilizando o aparelho Step One™ Real Time PCR System (Appllied Biosystems®). Todas as reações foram realizadas em duplicatas em volume total de 10uL contendo 5uL Sybr Green ER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen Tech-LineSM), 0,1uM de cada par de oligonucleotídeo (Appllied Biosystems®) e 1 uL de DNA. O volume foi ajustado com H₂O estéril livre de DNase e RNase. A termociclagem utilizada foi de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de PCR foi feita a curva de dissociação (curva de melting) com temperatura entre 60°C e 95°C. Todas as reações foram feitas em placas MicroAmp optical 48-well e adesivos ópticos (Applied Biosystems). Os dados foram analisados utilizando o programa Step One™ (Appllied Biosystems®).

Análise dos Resultados

Para comparação entre as técnicas de PCR convencional(método qualitativo) com o PCR em tempo real, houve a necessidade de realização de um score para ambas as técnicas para uma melhor correlação entre as ambas, pois apenas a dicotomização não seria possível devido a técnica do PCR em tempo real possuir 3 score.

Para isso os resultados obtidos com o PCR em tempo real de acordo com a quantificação das amostras em comparação com os Ct (cycle treshold) da curva padrão foram divididos em: concentração $<10^6$ (score 1-amostras mais diluídas), $\geq 10^6$ (score 2-amostras com maior concentração de DNA) ausência de amplificação (score 0).

Para a técnica PCR semi quantitativo, foi realizado dois score em presente (score 1) e ausente (score 0), assim foi possível correlacionar as duas técnicas.

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 26 de março de 2010.

TELMA BLANCA LOMBARDO BEDRAN