

FERNANDA CRISTINA SALES SALINEIRO

**Ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em
crianças brasileiras indígenas e não indígenas**

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

Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

ARAÇATUBA – SP

2009

A minha filha, Ana Luísa, que mesmo com a ausência da mamãe nos primeiros anos de sua vida, sempre demonstrou carinho e admiração por mim e aos meus pais, por me ajudarem a realizar mais um sonho.

Aos meu pais pela paciência e apoio, a Deus por sempre me iluminar e me guiar pelos melhores caminhos.

Ao meu orientador, Prof. Elerson Gaetti Jardim Júnior, por tudo que sempre fez por mim, pelas oportunidades que me ofereceu e todo o conhecimento que me oferece até hoje.

A Prof.^a Ana Claudia Okamoto por ter me iniciado na carreira acadêmica, por ter me ensinado como trabalhar e valorizar tudo que temos em nossas vidas e saber utilizá-las da melhor forma.

As minhas colegas de laboratório pelas inúmeras horas trabalhando juntas e pela convivência em harmonia sempre.

A todos os meus professores da graduação que me ensinaram muitas coisas e me modelaram, fazendo de mim uma profissional com caráter.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de graduação e aos diretores, Pedro Felício Estrada Bernabé e Ana Maria Pires Soubhia, pelo incentivo aos alunos pelo início do trabalho de conclusão de curso no campos de Araçatuba.

A ciência permanecerá sempre a satisfação do desejo mais alto da nossa natureza, a curiosidade; fornecerá sempre ao homem o único meio que ele possui de melhora a própria sorte.

Ernest Renan

SALINEIRO, F.C.S. **Ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em crianças brasileiras indígenas e não indígenas.** 2009. 23 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

Resumo

A obtenção de dados microbiológicos e clínicos sobre as periodontopatias em populações humanas é relevante para o conhecimento de sua etiopatogênese e na elaboração e avaliação das políticas preventivas. Assim, o presente estudo tem como objetivos avaliar as condições periodontais e a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em crianças indígenas e não-indígenas, bem como a influência de fatores culturais, sócio-econômicos e de dieta na ocorrência desse microrganismo e sobre as condições periodontais e ocorrência desse microrganismo. Foram estudados 30 indígenas, que apresentam pouca miscigenação, com idade de 3 a 7 anos, que vivem na reserva Umutina, Estado do Mato Grosso, bem como 40 crianças não-índias, da mesma faixa etária na região de Araçatuba. Realizou-se o exame clínico periodontal da população alvo, após a concordância de seus pais ou responsáveis, bem como de suas lideranças locais. A coleta dos espécimes de biofilme subgingival foi feita com cones de papel, que foram introduzidos nos sulcos gengivais ou bolsas periodontais e transferidos para água Milli-Q. A detecção desse cocobacilo foi realizada através de PCR e Real-Time PCR. A análise estatística avaliou a possibilidade de inter-relações entre os parâmetros clínicos e microbiológicos, bem como as possíveis diferenças entre brasileiros indígenas e não indígenas. Verificou-se que a ocorrência desse microrganismo foi significativamente mais elevada em não índios e que, nas amostras positivas dessas crianças, as populações desse microaerófilo foram mais elevadas do que o observado em crianças índias.

Palavras-chave: crianças, bactéria, gengivite, prevenção, ambiente, indígenas.

SALINEIRO, F.C.S. **Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in brazilian children indian and non-indian.** 2009. 23 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

Abstract

Obtaining data on the clinical and microbiological periodontal in human populations is relevant to the knowledge of its etiopathogenesis and the development and evaluation of preventive policies. So, this study aims to assess the health conditions and the occurrence of periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* children in indigenous and non-indigenous as well as the influence of cultural factors, socio-economic and diet in the occurrence of this microorganism and the conditions of periodontal health and occurrence of this microorganism. Were studied 30 native, showing little mixing, aged 3 to 7 years, living in the reserve Umutina, State of Mato Grosso, as well as 40 non-Indian children of that age group in the region of Araçatuba. There was a clinical periodontal examination of the target population, after the agreement of their parents or guardians, as well as their local leaders. The collection of specimens of subgingival biofilm was made with paper cones, which were introduced in the gingival sulcus or periodontal pockets and transferred to Milli-Q water. The detection of coccobacillus was performed by PCR and Real-Time PCR. The statistical analysis evaluated the possibility of inter-relationships between clinical and microbiological parameters as well as possible differences between indigenous and non-indigenous Brazilians. It was found that the occurrence of this pathogen was significantly higher in non-Indians and that, in the positive samples of these children, people that microaerophilic were higher than that observed in Indian children.

Keywords: children, bacteria, gingivitis, prevention, environment, indigenous.

Lista de Tabelas

	Pag.
Tabela 1- Ocorrência de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> na saliva, biofilme supra e subgingival de crianças indígenas e não indígenas com diferentes condições periodontais. Dados obtidos por PCR	09
Tabela 2- Ocorrência de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> na saliva, biofilme supra e subgingival de crianças indígenas e não indígenas com diferentes condições periodontais. Dados obtidos por real-time PCR	10
Tabela 3- Populações de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> na saliva, biofilme supra e subgingival de crianças indígenas e não indígenas com diferentes condições periodontais. Dados Obtidos por real-time PCR	11

Sumário	Pag.
1- Introdução	01
2- Proposição	03
3- Materiais e Métodos	03
3.1- População estudada	03
3.2- Exames clínicos	04
3.3- Obtenção dos espécimes clínicos	05
3.4- Extração do DNA bacteriano e determinação de sua concentração	06
3.4.1- Detecção de A. actinomycetemcomitans por PCR convencional	06
3.4.2- Análise Quantitativa por “Real –Time PCR”	06
4- Análise Estatística	07
5- Resultados	08
6- Discussão	12
7- Conclusão	14
8- Referências	15
9- Anexos	20
Anexo a	20
Anexo b	22

1- Introdução

Algumas estimativas sugerem que a população autóctone brasileira, no período anterior aos primeiros contatos com europeus, somava milhões de indivíduos, divididos em vários troncos lingüísticos. A Fundação Nacional do Índio estima que, no Brasil, vivem cerca de 350 mil índios, distribuídos entre 215 sociedades indígenas, cujas comunidades se encontram em diferentes estados de integração com a sociedade brasileira não índia. Esses estados de integração vão desde grupos isolados até etnias totalmente integradas, com a substituição de seus valores culturais pelos padrões apresentados pelas comunidades não índias.

De acordo com o contato que esses grupos humanos possuem com comunidades externas, não-índias, a distribuição, características clínicas e a evolução das patologias bucais, como as periodontopatias, sofrem alterações, refletindo mudanças de hábitos, dentre outros fatores (ARANTES et al., 2001), como o aumento vertiginoso na ocorrência de “diabetes mellitus” em populações indígenas com intenso contato com não-índios (BJELLAND et al., 2002).

Entre as doenças que acometem o aparelho estomatognático, merecem destaque as periodontopatias, que possuem um caráter endógeno e estão associadas à formação de um biofilme microbiano complexo, onde espécies bacterianas desempenham um papel específico na patogênese dessas condições, quer através de danos diretos aos tecidos do hospedeiro, quer através de fenômenos inflamatórios e imunologicamente mediados (FENG e WEINBERG, 2006), sendo que as gengivites, em particular, são quase universais em crianças e podem criar condições favoráveis para o desenvolvimento de futuras perdas de inserção do elemento dental (COUTINHO e TOSTES, 1997; XAVIER et al., 2007).

Contudo, a despeito da importância de diferentes fatores no desenvolvimento das periodontopatias, pouca atenção tem sido dada às características peculiares da epidemiologia dessas patologias bucais em populações indígenas (CAMPBELL et al., 2005), sendo que os poucos dados disponíveis, quase que invariavelmente, refletem as características prevalentes entre populações indígenas bastante miscigenadas na América do Norte (SKREPCINSK e NIENDORFF, 2000).

Essa escassez de dados é ainda mais significativa quando os aspectos epidemiológicos e predisponentes das periodontopatias das populações indígenas da América Latina são analisados (RONDEROS et al., 2001; DOWSETT et al., 2002), sendo que, nessas comunidades, os aspectos étnico-raciais ainda preservam características peculiares que se perderam na maioria das populações indígenas norte americanas (RONDEROS et al., 2001).

As informações disponíveis sobre as transformações da microbiota periodontal dessas populações autóctones, ao longo do processo de integração na sociedade não índia, são escassas, particularmente nas comunidades que ainda mantêm fortes laços culturais, sociais e lingüísticos com o seu passado, como acontece com as etnias da reserva Umutina, no estado do Mato Grosso, onde a miscigenação com não-índios é uma característica rara.

A patogênese das periodontopatias está ligada a diferentes espécies microbianas, destacando-se *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nas modalidades clínicas mais agressivas dessas doenças, particularmente em pacientes mais jovens, relacionados a outros microrganismos Gram-positivos e negativos (MIURA et al., 2005; YANG et al., 2005; FENG e WEINBERG, 2006). A distribuição de alguns desse cocobacilo ainda possui marcada influência étnico-racial (GAETTI-JARDIM Jr. et al., 2006; ROSALÉM Jr. et al., 2006), sendo muito mais freqüente em populações africanas ou afrodescendentes (HAFFAJEE et al., 2004; LEUNG et al., 2005).

Sabe-se que as bactérias anaeróbias e microaerófilas bucais estão envolvidas em diversos outros processos infecciosos. Entretanto, poucos são os laboratórios clínicos ou de pesquisa, no Brasil, que realizam o isolamento, identificação e detecção desses microrganismos, seja por métodos convencionais quanto moleculares (GAETTI-JARDIM JR, 1997; PAULA ET AL., 2003), sendo que os métodos moleculares constituem importantes e precisas ferramentas de diagnóstico clínico e identificação das espécies microbianas bucais (KUBONIWA et al., 2004; SANZ et al., 2004; YAMAURA et al., 2005), colaborando na compreensão das inter-relações entre essa microbiota e seu hospedeiro (SAYGUN et al., 2005). Dentre essas metodologias, destaca-se o Real-Time PCR, que fornece dados quantitativos e qualitativos da população microbiana envolvida nos processos infecciosos periodontais (SANZ et al., 2004; LEUNG et al., 2005).

2- Proposição

Assim, considerando-se a importância de estudos sobre a distribuição e caracterização das periodontopatias em crianças indígenas e não-indígenas, para a elaboração de políticas de saúde específicas para diferentes etnias e grupos sociais, bem como a necessidade de uma caracterização da microbiota associada às mesmas, o presente estudo objetivou caracterizar a ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em 30 crianças com idade de 3 a 7 anos da reserva indígena Umutina, Estado do Mato Grosso, bem como de 40 crianças não-índias na mesma faixa etária, além de determinar, através de PCR convencional e Real Time PCR, correlacionando com as condições periodontais das mesmas com as condições periodontais, socioeconômicas, de dieta e culturais.

3- Material e métodos

Todos os procedimentos clínicos e laboratoriais do presente estudo foram acompanhados e receberam a colaboração de alunos de doutorado e mestrado em Estomatologia além de estagiários da FOA-UNESP e colaboração de pesquisadores do Laboratório de Anaeróbios do ICB-USP e do corpo de saúde da FUNASA (médicos, dentistas e enfermeiros). O exame clínico e radiográfico da população indígena, bem como a coleta dos espécimes clínicos foram realizados por especialistas em Periodontia e Odontologia Preventiva previamente calibrados.

As amostras clínicas oriundas das crianças indígenas e não indígenas, mantidas em gelo, eram entregues no laboratório, juntamente com os dados referentes às condições periodontais e radiográficas dos pacientes examinados e fazia-se a extração do DNA microbiano, bem como a detecção do microrganismo alvo através do PCR convencional e do real-time PCR. As inter-relações entre os parâmetros sociais, clínico-radiográficos e microbiológicos foram determinadas com auxílio da Prof. Dra Christiane Marie Schweitzer, diretora do Núcleo de Tecnologia da Informação e docente do Centro de Matemática e Estatística-Universidade Federal do ABC.

3.1- População estudada

O grupo amostral submetido à avaliação clínica, radiográfica, sócio-econômica e cultural foi constituído por 30 crianças indígenas, com idade de 3 a 7 anos, independentemente de gênero, e que não fizeram uso de antimicrobianos nos três meses que precederam a coleta dos espécimes clínicos. As crianças não apresentavam histórico de miscigenação com não-índios e pertenciam às etnias Umutina, Paresi, Bororo, Bakairi,

Kayabi, Irantxe, Nambikwara e Terena, que vivem na aldeia Umutina, Estado do Mato Grosso. Crianças que possuíam patologias sistêmicas ou necessidades especiais não participaram do estudo (HAFFAJEE et al., 2004). Para o grupo de 40 crianças não índias, foram utilizados os mesmos critérios de inclusão e exclusão descritos acima, sendo que as mesmas serão selecionadas em escolas da rede pública de ensino Araçatuba, São José do Rio Preto e região.

Baseado nos dados sobre a distribuição das condições socioeconômicas da população indígena estudada, se procurou compor o grupo de crianças não-indígenas de forma que o mesmo apresente condições equivalentes às apresentadas pelas famílias da reserva Umutina, guardadas as limitações de estudos comparativos dessa natureza, utilizando-se, para tanto de software de busca parametrizada desenvolvido pela Professora Dra. Christiane Marie Schweitzer.

Os pais e/ou responsáveis pelas crianças indígenas, bem como os líderes da comunidade, receberam instruções sobre a importância e objetivos do estudo, bem como as autoridades de saúde da FUNASA e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Assim, a seleção e o atendimento da comunidade foram realizados com o consentimento da população envolvida, anuência da FUNASA e do Conselho de Saúde da comunidade, o qual também informou as condições de saúde sistêmica e peculiaridades da população alvo.

No caso das crianças não índias, os pais e responsáveis receberam instruções semelhantes e somente participarão do estudo as crianças que consentirem e cujos pais autorizaram sua participação. Foram selecionadas crianças que, em função de local de residência, aspectos socioeconômicos e culturais não estavam recebendo tratamento odontológico preventivo ou curativo.

3.2- Exames clínicos

Os exames clínicos da população indígena foram realizados entre meados de 2007 e fevereiro de 2008, enquanto as crianças não-índias foram selecionadas e examinadas no primeiro trimestre de 2008.

Inicialmente precedeu-se a anamnese, em formulários padronizados, constando a identificação do paciente, idade, aspectos étnicos, história da doença atual, histórias social, médica e familiar. Quando necessário, o antropólogo da aldeia colaborou no preenchimento dos formulários, juntamente com os profissionais de saúde envolvidos. A seguir, realizou-se o exame clínico intra e extra bucal.

Os exames clínicos periodontais foram realizados por um único examinador previamente treinado, utilizando-se os critérios do *Periodontal Screening and Recording* (PSR). O exame foi realizado com o uso de espelho bucal plano, pinça para algodão (Duflex^R), sondas periodontais milimetradas tipo Williams (Trinity^R) e sondas periodontais (Trinity^R), semelhantes às sondas número 621 da Organização Mundial de Saúde, recomendada pela American Dental Association e American Association of Periodontology.

Este último tipo de sonda apresenta uma esfera de 0,5 mm de diâmetro na sua ponta ativa, de particular importância para detecção de cálculo, evitando também o aprofundamento excessivo na bolsa periodontal. Os dados coletados eram registrados em ficha apropriada, segundo recomendação da ADA e AAP. Todos os pacientes e sadios receberam palestras individuais sobre instruções de higiene oral, seguindo a técnica de escovação preconizada por Bass, utilização de fio/fita dental e uso de escovas interdentais.

No exame periodontal complementar, foram considerados o índice sangramento gengival (AINAMO e BAY, 1975), presença de cálculo supragengival, determinação da profundidade clínica de sondagem e o nível clínico de inserção (RAMFJORD, 1959), índice de higiene oral (O'LEARY et al., 1972), com utilização de verde de malaquita (2%, o qual não apresenta atividade antimicrobiana significativa).

As crianças não-índias foram examinadas de forma semelhante à descrita acima e foram encaminhadas para tratamento preventivo e curativo junto à Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP.

3.3- Obtenção dos espécimes clínicos

Os espécimes clínicos foram coletados de três sítios periodontais por paciente, que foram divididos em pacientes sadios, portadores de gengivite ou portadores de periodontite. A coleta dos espécimes do biofilme subgengival foi realizada após a remoção do biofilme supragengival (profilaxia dental). A coleta foi realizada por meio de cones de papel absorvente esterilizados, que eram introduzidos no interior dos sulcos gengivais (ou bolsas periodontais), onde permaneceram por 60 segundos (SLOTS, 1982; GAETTI-JARDIM JR. et al., 1996). Também foram coletados espécimes clínicos de saliva e biofilme supragengival, estes últimos com auxílio de curetas periodontais.

Todos os espécimes coletados foram transferidos imediatamente para criotubos contendo água ultrapura Milli-Q e mantidos em nitrogênio líquido. A seguir as amostras (oriundas da área indígena) foram enviadas, sob refrigeração (-196°C), por via aérea até a Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, para extração do DNA microbiano presente.

3.4- Extração do DNA bacteriano e determinação de sua concentração

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água Milli Q foi extraído através do “kit” QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante e as concentrações dos DNA bacterianos foram determinadas em espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640), com leitura da absorbância ($A_{260\text{ nm}}$).

3.4.1- Detecção de *A. actinomycetemcomitans* por PCR convencional

A detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pela amplificação do DNA por PCR convencional foi realizada empregando-se os iniciadores utilizados previamente por Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez.

A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 μl , contendo 2,5 μl de 10 X tampão PCR, 1,25 μl de MgCl_2 (50 mM), 2,0 μl de dNTP (10 mM), 0,25 μl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U), 1,0 μl de cada iniciador (0,4 μM), 7 μl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 μl de DNA (ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Amplitherm, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); 35 ciclos de 94°C (1 min.), 60°C (1 min.), 72°C (1 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min.).

Em todas as reações foram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência do microrganismo estudado (Y4). Como controle de peso molecular foi utilizado o marcador 1 Kb DNA ladder (Gene Ruler™). Os produtos da amplificação pelo PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e fotografados sobre transiluminador com luz UV com câmara Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120).

3.4.2- Análise Quantitativa por “Real-Time PCR”

Foram utilizadas seqüências baseadas nos genes da região 16SrRNA do genoma, específicas para os organismos em estudo (MAEDA et al., 2003). A sonda fluorescente que foi utilizada no sistema TaqMan é marcada no sentido 5' com 6-carboxifluoresceína (*reporter dye*) e no sentido 3' com 6-carboxitetrametilrodamina (*quencher dye*). A emissão fluorescente desse sistema TaqMan depende de uma sonda (equivalente a um terceiro iniciador) que anelava especificamente entre os dois iniciadores utilizados, o que torna o processo mais

preciso e específico. Além desse aspecto, só há a detecção da amplificação quando existem sítios de anelamento tanto para o par de iniciadores como para a sonda.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µl, contendo de 1 X de Master Mixture TaqMan Universal (tampão PCR, dNTP, AmpliTaq Gold, sinal de referência interno, [6-carboxi-'x'-rodamina], uracil *N*-glicosidase-UNG, MgCl₂; Applied Biosystem, Foster City, Calif), 900 nM de cada iniciador, 200 nM da sonda e 5 µl do DNA. As curvas-padrão foram construídas a partir de diluições conhecidas de DNA.

Essas reações de amplificação foram realizadas em aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Australia) programado para um ciclo a 94°C (10 min.), 40 ciclos a 95°C (15s.), 60°C (60s.), produzindo fragmentos aproximados de 1098 bp obtidos e comparados ao controle. A análise dos dados foi realizada com o programa incorporado no sistema de detecção. A linha “*threshold*” foi definida como aquela referente ao ciclo de amplificação em que a fluorescência emitida pela amostra mostrar-se superior à fluorescência de fundo da reação e será inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias do DNA alvo presentes no início do processo.

Em todos os testes de amplificação do DNA por PCR e real-time PCR serão utilizados controles positivos constituídos de DNA obtido das cepas de referência *A. actinomycetemcomitans* JP2 e ATCC 33384 e controle negativo, sem DNA.

4- Análise Estatística

As amostras permitiram, através de estatísticas pontuais e intervalos de confiança, caracterizar as populações indígenas quanto aos parâmetros microbiológicos. Prevalência e análise de risco serão feitas utilizando-se as estatísticas de Cochran e Mantel-Haenszel para variáveis dicotômicas, ou teste de Qui-quadrado de Pearson para análise de proporções quando as variáveis possuírem três ou mais categorias. A presença ou ausência desse microrganismo foi avaliada através de ANOVA de resultados repetitivos. A inter-relação entre a ocorrência do microrganismo alvo e os parâmetros clínicos foi avaliada através do teste exato de Fisher. A análise estatística foi realizada no Centro de Matemática Computação e Cognição da Universidade Federal do ABC.

5- Resultados

Os resultados obtidos com o PCR convencional apresentaram boa correlação com os dados do real-time PCR, sendo que a sensibilidade dos dois métodos se mostrou similar, embora para as amostras de indivíduos periodontalmente saudáveis o real-time PCR tenha se mostrado ligeiramente mais sensível, embora sem significância estatística (ANOVA de resultados repetitivos, $P= 0,061$).

A ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* entre crianças índias saudáveis e crianças não índias saudáveis foi significativamente diferente apenas para os resultados oriundos do sulco gengival, sendo que a modesta quantidade de amostras positivas obtidas a partir do biofilme supragengival e saliva desses pacientes não permite uma comparação estatística mais adequada. Por outro lado, nas crianças com gengivite, as que não viviam na reserva Umutina foram colonizadas por uma frequência muito mais elevada por esse microaerófilo, tendo sido encontrado em uma frequência mais elevada na saliva (teste de Mann-Whitney, $P= 0,047$), no biofilme supragengival (teste de Mann-Whitney, $P= 0,021$) e biofilme subgengival (teste de Mann-Whitney, $P= 0,006$), sendo que a ocorrência desse microrganismo mostrou correlação com o índice de placa (teste de Qui-quadrado, $P= 0,028$) e inflamação gengival (teste de Qui-quadrado, $P= 0,008$).

Tabela 1. Ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva, biofilme supra e subgengival de crianças indígenas e não indígenas com diferentes condições periodontais. Dados obtidos por PCR.

Amostra clínica	Pacientes estudados			
	CIPS ¹ N=11	CIG ² N=19	CNIPS ³ N=23	CNIG ⁴ N=17
Saliva	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,35)	3 (17,65)*
Biofilme supragengival	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (17,39)	8 (47,06)*
Biofilme subgengival	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (30,43)*	10 (58,82)*

¹Crianças índias periodontalmente saudáveis

²Crianças índias com gengivite

³Crianças não índias periodontalmente saudáveis

⁴Crianças não índias com gengivite

Tabela 2. Ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva, biofilme supra e subgengival de crianças indígenas e não indígenas com diferentes condições periodontais. Dados obtidos por real-time PCR.

Amostra clínica	Pacientes estudados			
	CIPS ¹ N=11	CIG ² N=19	CNIPS ³ N=23	CNIG ⁴ N=17
Saliva	0 (0,0)	1 (5,26)	1 (4,35)	5 (29,41)*
Biofilme supragengival	0 (0,0)	1 (5,26)	3 (13,04)	10 (58,82)*
Biofilme subgengival	0 (0,0)	1 (5,26)	9 (39,13)*	10 (58,82)*

¹Crianças índias periodontalmente saudáveis

²Crianças índias com gengivite

³Crianças não índias periodontalmente saudáveis

⁴Crianças não índias com gengivite

Além da ocorrência desse microrganismo, em termos qualitativos, como descrito nas tabelas 1 e 2, os dados da tabela 3 evidenciam que as populações desse microrganismo são muito mais elevadas nos espécimes positivos obtidos de crianças não índias (ANOVA, P= 0,003) e no biofilme subgengival, sendo que a contaminação salivar mostra refletir pobremente a população desse patógeno no biofilme (Índice de correlação -453, P= 0,021).

Tabela 3. Populações de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva, biofilme supra e subgingival de crianças indígenas e não indígenas com diferentes condições periodontais. Dados Obtidos por real-time PCR.

Amostra clínica	Cópias de DNA alvo nas amostras média ± desvio padrão			
	CIPS ¹	CIG ²	CNIPS ³	CNIG ⁴
Saliva	ND	1,46. 10	1,32 .10 ²	1,23 .10 ³ ± 0,88 .10 ³
Biofilme supragingival	ND	1,8 .10 ³	3,1 .10 ² ± 0,37 .10 ²	8,3 .10 ³ ± 1,9 .10 ³
Biofilme subgingival	ND ⁵	3,11 .10 ²	4,22 .10 ³ ± 1,18 .10 ³	2,82 .10 ⁴ ± 0,67 .10 ⁴

¹Crianças índias periodontalmente saudáveis

²Crianças índias com gengivite

³Crianças não índias periodontalmente saudáveis

⁴Crianças não índias com gengivite

⁵ND: não detectado

6- Discussão

Dentre os principais microrganismos associados aos quadros infecciosos periodontais, merece destaque *A. actinomycetemcomitans*, freqüentemente ligado aos quadros mais agressivos dessas doenças (CORTELLI et al., 2005; GAETTI-JARDIM Jr. et al., 2006; LAFAURIE et al., 2007; CARVALHO et al., 2009), mas também implicado em infecções crônicas (TIMMERMAN et al., 2001; AVILA-CAMPOS & VELASQUEZ-MELENDEZ, 2002; DOGAN et al., 2003; EBERSOLE et al., 2008).

A. actinomycetemcomitans merece destaque por ser um dos microrganismos bucais cuja distribuição apresenta notável influência das características étnicas e geográficas das populações envolvidas (RYLEV & KILIAN, 2008), tendo sido detectado em 35%-45% dos pacientes norte americanos com periodontite crônica (EBERSOLE et al., 2008; ANGELOV et al., 2009), de 52% a 90% dos brasileiros com essa condição periodontal (AVILA-CAMPOS & VELÁSQUEZ-MELENDEZ, 2002; COLOMBO et al., 2005), 65,5% das pacientes grávidas norte-americanas com esse tipo de periodontite (PERSSON et al., 2008), de 76 a 93,5% dos pacientes tailandeses descritos por Hintao et al. (2007) e 86,4% dos mexicanos com periodontite (XIMENEZ-FYVIE et al., 2006), além de elevada prevalência na África do Norte (HAUBEK et al., 2008) e China (TONG et al., 2003; WU et al., 2007).

Contudo, Tanner et al. (2007) observaram esse microaerófilo em apenas pouco de mais de 20% das lesões iniciais de periodontite, enquanto Eguchi et al. (2008) detectaram-no em apenas 10,9% dos pacientes com abscesso periodontal, no Japão, e Lafaurie et al. (2007), em com diversas populações colombianas, verificaram a presença desse microaerófilo em aproximadamente 15%, 18%, 33%, 28% e 5% dos indivíduos com periodontite crônica localizada, generalizada, periodontite agressiva localizada, generalizada e em indivíduos saudios, respectivamente. Além desses grupos, uma baixa prevalência desse microaerófilo na Colômbia (BOTERO et al., 2007a; HERRERA et al., 2008), Holanda (BOUTAGA et al., 2006) e Espanha (HERRERA et al., 2008) vem sendo relatada, com uma ocorrência sempre inferior a 20% em casos de periodontite e 10% na população saudável.

A ocorrência desse microrganismo para as crianças indígenas mostrou-se inferior a dados relativos a outras populações brasileiras, onde o mesmo foi detectado de 40,3 % dos saudios (GAETTI-JARDIM Jr. et al., 2006) e de 50% a 80% dos pacientes com periodontite crônica (TONG et al., 2003; COLOMBO et al., 2005, CORTELLI et al., 2005), sendo que esses dados foram semelhantes aos obtidos para crianças não índias.

Entretanto, a grande heterogeneidade da população brasileira pode dificultar comparações entre os resultados obtidos com as crianças não índias e dados oriundos de outras

áreas geográficas visto que a denominação “não índio” não traz em si mesma nenhuma característica do ponto de vista racial e é muito provável que parcela significativa dessas crianças tenha DNA mitocondrial tipicamente americano, enquanto os meninos teriam cromossomo Y tipicamente europeu ou ibérico, uma vez que a colonização do nosso país claramente evidencia o europeu mediterrâneo como pai e a índia e a mulher negra, escrava ou não, como as mães dessa população essencialmente mestiça.

Essa predileção racial desse microrganismo pode refletir os diferentes mecanismos de transmissão a que ele está sujeito e principalmente o processo de formação do povo brasileiro, como descrito sucintamente acima. Contudo, essa heterogeneidade de distribuição em diferentes populações humanas também pode estar associada à virulência dos vários sorotipos e genótipos dessa espécie, que condicionam o tipo de interação que as mesmas estabelecem com o hospedeiro (THIHA et al., 2007; HAUBEK et al., 2008), bem como com o fato de que essa espécie bacteriana parece evoluir principalmente através do acúmulo de mutações e menos devido à recombinação genética, o que tornaria os diferentes sorotipos verdadeiras subpopulações geneticamente isoladas cuja disseminação estaria intimamente ligada ao destino das populações humanas portadoras (HAUBEK et al., 2008; RYLEV & KILIAN, 2008).

O papel de *A. actinomycetemcomitans* nas doenças periodontais necessita ser mais bem avaliado, visto ter se mostrado bastante comum no biofilme sub e supra gengival de algumas populações (DAHLÉN & LEONHARDT, 2006; HINTAO et al., 2007) e mais raro ou ausente em populações autóctones da América do Sul e América Central, (IDE et al., 2000; DOWSETT et al., 2002). Alguns estudos mostram que, em certas populações, a ocorrência desse cocobacilo parece não afetar a saúde periodontal e sua distribuição pode ser ainda mais elevada em indivíduos saudáveis (MAYANAGI et al., 2004; DAHLÉN & LEONHARDT, 2006). Possivelmente essa heterogeneidade esteja associada à virulência dos vários sorotipos e clones que constituem essa espécie (THIHA et al., 2007; HAUBEK et al., 2008; CARVALHO et al., 2009), onde, na população brasileira não índia, o sorotipo B estaria mais associado às formas mais agressivas de periodontite e o sorotipo A colonizaria os indivíduos saudáveis (CARVALHO et al., 2009).

7- Conclusão

A ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* foi significativamente mais elevada em crianças brasileiras não índias do que nas crianças índias e esse microrganismo mostrou correlação com o índice de placa e inflamação gengival na população alvo.

8- Referências

1. AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v. 25, n. 4, p. 229-35, Dec. 1975.
2. ANGELOV, N. et al. Recovery of putative pathogens from paper point sampling at different depths of periodontal lesions. **Clin. Cosm. Invest. Dent.**, v.1, p. 1-5, 2009.
3. ARANTES, R.; SANTOS, R.V.; COIMBRA JR, C. E. A. Saúde bucal na população indígena Xavante de Pimentel Barbosa, Mato Grosso, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, n. 2, p. 375-384, 2001.
4. AVILA-CAMPOS, M. J.; VELASQUEZ-MELENDZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 44, p. 1-5, 2002.
5. BJELLAND, S. et al. Dentists, diabetes and periodontitis. **Aust.Dent. J.**, v. 47, p. 202-7, 2002
6. BOTERO, J. E. et al. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. **J. Periodontol.**, v. 78, p. 696-704, 2007.
7. BOUTAGA, K. et al. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, 427-433, 2006.
8. CAMPBELL, D. et al. Improving oral health of Alaska natives. **Amer. J. Pub. Health**, v. 95, n. 11, p. 1880, 2005.
9. CARVALHO, R. P. M. et al. Relationship of neutrophil phagocytosis and oxidative burst with the subgingival microbiota of generalized aggressive periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 24, p. 124-132, 2009.
10. COLOMBO, A. P. V. et al. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9 month results. **J. Periodontol.**, v. 76, p. 778-784, 2005.
11. CORTELLI, J. R. et al. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 32, p. 860-866, 2005.
12. COUTINHO, T. C. L.; TOSTES, M. A. A. Prevalência de gengivite em crianças. **RGO**, v. 45, p. 170-4, 1997.
13. DAHLÉN, G.; LEONHARDT, A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.21, p. 6-11, 2006.
14. DOGAN, B. et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 803-814, 2003.

15. DOWSETT, S. A.; ECKERT, G. J.; KOWOLIK, M. J. Comparison of periodontal disease status of adults in two untreated indigenous population of Guatemala, Central America. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, n.3, p. 784–7, 2002.
16. EBERSOLE, J. L. et al. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in hispanic Americans with type 2 diabetes. **J. Periodontol.**, v. 79, p. 637-646, 2008.
17. EGUCHI, T. et al. Microbial changes in patients with acute periodontal abscess after treatment detected by Pado Test. **Oral Dis.**, v. 14, p. 180-184, 2008.
18. FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontology 2000**, v.40, n.1, p. 50-76, 2006.
19. GAETTI-JARDIM JR, E. **Fatores envolvidos na virulência de *Fusobacterium nucleatum* isolados de primatas humanos e não humanos. Estudo comparativo.** 1997. 127 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
20. GAETTI-JARDIM JR, E.; ZELANTE, F.; AVILA-CAMPOS, M. J. Oral species of *Fusobacterium* from human and environmental samples. **J. Dent.**, v. 24, p. 345-8, 1996.
21. GAETTI-JARDIM JR., E et al. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects, and children with gingivitis in two cities of the State of São Paulo, Brazil. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 14, p. 153-6, 2006.
22. HAFFAJEE , A. D. et al. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, 996-1002, 2004.
23. HAUBEK, D. et al. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. **Lancet**, v. 371, p.237-242, 2008.
24. HERRERA, D. et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35, p. 106-113, 2008.
25. HINTAO, J. et al. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, p. 175-181, 2007.
26. IDE, L. et al. Occurrence of seven putative periodontal pathogens in the subgingival plaque of two native populations in the Xingu Indian park. **Anaerobe**, v. 6, 135-137, 2000.

27. KUBONIWA, M. et al. Quantitative detections of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, n. 3, p. 168-76, 2004.
28. LAFAURIE, G. I. et al. Demographic, clinical and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. **J. Periodontol.**, v. 78, p. 629-639, 2007.
29. LEUNG, W. K. et al. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from young Chinese aggressive periodontitis patients. **J. Periodontal Res.**, v. 40, n. 3, p. 258-68, 2005.
30. MAEDA, H. et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* and total bacteria. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 39, p. 81-6, 2003.
31. MAYANAGI, G. et al. Detection frequency of periodontitis associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 379-385, 2004.
32. MIURA, M. et al. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 40, p. 147-54, 2005.
33. O'LEARY, T. J.; DRAKE, R. B.; NAYLOR, J. E. The plaque control record. **J. Periodontol.**, v. 43, p. 38-56, 1972.
34. PAULA, M. O., GAETTI-JARDIM JR., E.; AVILA-CAMPOS, M. J. Plasmid profile in oral *Fusobacterium nucleatum* from humans and *Cebus apella* monkeys. **Rev. Inst. Méd. Trop. de São Paulo**, v. 45, n. 1, p. 5-9, 2003.
35. PERSSON, G. R. et al. *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in subgingival bacterial samples from parous women. **J. Periodontol.**, v. 79, p. 508-516, 2008.
36. RAMFJORD, S. P. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 30, p. 51-9, 1959.
37. RONDEROS M.; BRUCE L. HODGES, J. S. Periodontal disease among indigenous people in the Amazon rain forest. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 995-1003, 2001.
38. ROSALEM JUNIOR, W. et al. Analysis of leukotoxin gene types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Brazilians with aggressive periodontitis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 127-34, 2006.

39. RYLEV, M.; KILIAN, M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. **J. Clin. Periodontol.**, v. 35 (Suppl 8), p. 346-361, 2008.
40. SANZ, M. et al. 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. Periodont.**, v. 31, n. 12, p. 1034-47, 2004.
41. SAYGUN, I.; KUBAR, A.; ÖZDEMİR, A.; SLOTS, J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. **J. Periodont. Res.**, v. 40, p. 187-91, 2005.
42. SKREPCINSKI, F. B.; NIENDORFF, W. J. Periodontal disease in american indians and Alaska natives. **J. Public Health Dent.**, v. 60, p. 261-6, 2000.
43. SLOTS, J. Salient biochemical characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Arch. Microbiol.**, v. 131, p. 60-67, 1982.
44. TANNER, A. C. R. et al. Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, p. 917-930, 2007.
45. THIHA, K. et al. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. **Oral Microbiol. Immunol.**, v 22, p. 201-207, 2007.
46. TIMMERMAN, M. F. et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 617-627, 2001.
47. TONG, K. S. K. et al. Clinical responses to mechanical periodontal treatment in Chinese chronic periodontitis patients with and without *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontol.**, v. 74, p. 1582-1588, 2003.
48. WU, Y. M. et al. Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. **J. Zhejiang Univ. Sci B** 8: 121-131, 2007.
49. XAVIER, A. S. S. et al. Condições gengivais de crianças com idade entre 6 e 12 anos: aspectos clínicos e microbiológicos. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integrad, João Pessoa**, v. 7, p. 29-35, 2007.
50. XIMENEZ-FYVIE, L. A. et al. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. **J. Periodontol.**, v. 77, p. 460-471, 2006.

51. YAMAURA, M.; SATO,T.; ECHIGO, S.; TAKAHASHI, N. Quantification and detection of bacteria from postoperative maxillary cyst by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 20, n. 6, p. 333-8, 2005.
52. YANG, H-W et al. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 113, p. 28-35, 2005.

ANEXOS

Anexo a – Comitês de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-

OF. 113/2006
CEP
SFCD/bri

Araçatuba, 11 de agosto de 2006.

Referência Processo FOA 2006-01417

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável do relator que analisou o projeto **“ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DAS LESÕES ORAIS E AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL EM UMA COMUNIDADE INDÍGENA BRASILEIRA”** expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado relatório parcial em 10/08/2007 e o relatório final em 10/08/2008.

Stefan Finza de Carvalho Dekon
Prof. Dr. Stefan Finza de Carvalho Dekon
Coordenador do CEP

Ilmo. Senhor
Dr. ELERSON GAETTI JARDIM JUNIOR
Araçatuba-SP-

Ciente. De acordo.
19/10/06
[Signature]
Dr. Elerson Gaetti Jardim Junior



GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
Escola de Saúde Pública de Mato Grosso
Coordenação de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/SES/MT

Protocolo nº 239/07-CEP/SES-MT
Data do recebimento: 30/11/2006

Ofício nº 021/07 CEP/SES-MT

Cuiabá, 07 de março de 2007.

À Senhora
Evanice Menezes Marçal Vieira
Pesquisadora Responsável

Assunto: Parecer do projeto de pesquisa

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso analisou o protocolo de pesquisa intitulado: **“Estudo das condições de saúde bucal e avaliação da microbiota periodontopatogênica em uma comunidade indígena brasileira”**, sendo o mesmo enquadrado na categoria **“Aprovado”**.

Conforme Resolução do CNS nº196/06 item IX.2.c, cabe ao pesquisador apresentar relatórios da pesquisa ao Comitê a partir da data de sua aprovação, ficando assim definido: relatório parcial dia 07/06/07 e relatório final dia 07/09/07, cumprindo assim as prerrogativas da resolução em pauta.

Atenciosamente,

Valdete Marques Arnaut Antiquiera
Valdete Marques Arnaut Antiquiera
Coordenadora do CEP/SES/MT

Anexo b – Artigo a ser enviado para a revista PEDIATRIC DENTAL JOURNAL

Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in brazilian children indian and non-indian.

Salineiro, Fernanda Cristina Sales; Vieira, Evanice Marçal Menezes; Gaetti – Jardim, Elerson Júnior.

Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica FOA-UNESP

Rua José Bonifácio N°.1193

CEP: 16015-050

Araçatuba – São Paulo – Brasil

Fernanda Cristina Sales Salineiro

Rua Primeiro de Maio N°.856 – APTO. 113

CEP: 16015-550

Araçatuba – São Paulo – Brasil

FAX: (55-18-3622-2476)

E-mail: f.salineiro@gmail.com

Abstract

Obtaining data on the clinical and microbiological periodontal in human populations is relevant to the knowledge of its etiopathogenesis and the development and evaluation of preventive policies. So, this study aims to assess the health conditions and the occurrence of periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* children in indigenous and non-indigenous as well as the influence of cultural factors, socio-economic and diet in the occurrence of this microorganism and the conditions of periodontal health and occurrence of this microorganism. Were studied 30 native, showing little mixing, aged 3 to 7 years, living in

the reserve Umutina, State of Mato Grosso, as well as 40 non-Indian children of that age group in the region of Araçatuba. There was a clinical periodontal examination of the target population, after the agreement of their parents or guardians, as well as their local leaders. The collection of specimens of subgingival biofilm was made with paper cones, which were introduced in the gingival sulcus or periodontal pockets and transferred to Milli-Q water. The detection of coccobacillus was performed by PCR and Real-Time PCR. The statistical analysis evaluated the possibility of inter-relationships between clinical and microbiological parameters as well as possible differences between indigenous and non-indigenous Brazilians. It was found that the occurrence of this pathogen was significantly higher in non-Indians and that, in the positive samples of these children, people that microaerophilic were higher than that observed in Indian children.

Keywords: children, bacteria, gingivitis, prevention, environment, indigenous.

Introdução

Algumas estimativas sugerem que a população autóctone brasileira, no período anterior aos primeiros contatos com europeus, somava milhões de indivíduos, divididos em vários troncos lingüísticos. A Fundação Nacional do Índio estima que, no Brasil, vivem cerca de 350 mil índios, distribuídos entre 215 sociedades indígenas, cujas comunidades se encontram em diferentes estados de integração com a sociedade brasileira não índia. Esses estados de integração vão desde grupos isolados até etnias totalmente integradas, com a substituição de seus valores culturais pelos padrões apresentados pelas comunidades não índias.

De acordo com o contato que esses grupos humanos possuem com comunidades externas, não-índias, a distribuição, características clínicas e a evolução das patologias bucais, como as periodontopatias, sofrem alterações, refletindo mudanças de hábitos, dentre outros

fatores (ARANTES et al., 2001), como o aumento vertiginoso na ocorrência de “diabetes mellitus” em populações indígenas com intenso contato com não-índios (BJELLAND et al., 2002).

Entre as doenças que acometem o aparelho estomatognático, merecem destaque as periodontopatias, que possuem um caráter endógeno e estão associadas à formação de um biofilme microbiano complexo, onde espécies bacterianas desempenham um papel específico na patogênese dessas condições, quer através de danos diretos aos tecidos do hospedeiro, quer através de fenômenos inflamatórios e imunologicamente mediados (FENG e WEINBERG, 2006), sendo que as gengivites, em particular, são quase universais em crianças e podem criar condições favoráveis para o desenvolvimento de futuras perdas de inserção do elemento dental (COUTINHO e TOSTES, 1997; XAVIER et al., 2007).

Contudo, a despeito da importância de diferentes fatores no desenvolvimento das periodontopatias, pouca atenção tem sido dada às características peculiares da epidemiologia dessas patologias bucais em populações indígenas (CAMPBELL et al., 2005), sendo que os poucos dados disponíveis, quase que invariavelmente, refletem as características prevalentes entre populações indígenas bastante miscigenadas na América do Norte (SKREPCINSK e NIENDORFF, 2000).

Essa escassez de dados é ainda mais significativa quando os aspectos epidemiológicos e predisponentes das periodontopatias das populações indígenas da América Latina são analisados (RONDEROS et al., 2001; DOWSETT et al., 2002), sendo que, nessas comunidades, os aspectos étnico-raciais ainda preservam características peculiares que se perderam na maioria das populações indígenas norte americanas (RONDEROS et al., 2001).

As informações disponíveis sobre as transformações da microbiota periodontal dessas populações autóctones, ao longo do processo de integração na sociedade não índia, são escassas, particularmente nas comunidades que ainda mantém fortes laços culturais, sociais e

lingüísticos com o seu passado, como acontece com as etnias da reserva Umutina, no estado do Mato Grosso, onde a miscigenação com não-índios é uma característica rara.

A patogênese das periodontopatias está ligada a diferentes espécies microbianas, destacando-se *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nas modalidades clínicas mais agressivas dessas doenças, particularmente em pacientes mais jovens, relacionados a outros microrganismos Gram-positivos e negativos (MIURA et al., 2005; YANG et al., 2005; FENG e WEINBERG, 2006). A distribuição de alguns desse cocobacilo ainda possui marcada influência étnico-racial (GAETTI-JARDIM Jr. et al., 2006; ROSALÉM Jr. et al., 2006), sendo muito mais freqüente em populações africanas ou afrodescendentes (HAFFAJEE et al., 2004; LEUNG et al., 2005).

Sabe-se que as bactérias anaeróbias e microaerófilas bucais estão envolvidas em diversos outros processos infecciosos. Entretanto, poucos são os laboratórios clínicos ou de pesquisa, no Brasil, que realizam o isolamento, identificação e detecção desses microrganismos, seja por métodos convencionais quanto moleculares (GAETTI-JARDIM JR, 1997; PAULA ET AL., 2003), sendo que os métodos moleculares constituem importantes e precisas ferramentas de diagnóstico clínico e identificação das espécies microbianas bucais (KUBONIWA et al., 2004; SANZ et al., 2004; YAMAURA et al., 2005), colaborando na compreensão das inter-relações entre essa microbiota e seu hospedeiro (SAYGUN et al., 2005). Dentre essas metodologias, destaca-se o Real-Time PCR, que fornece dados quantitativos e qualitativos da população microbiana envolvida nos processos infecciosos periodontais (SANZ et al., 2004; LEUNG et al., 2005).

Assim, considerando-se a importância de estudos sobre a distribuição e caracterização das periodontopatias em crianças indígenas e não-indígenas, para a elaboração de políticas de saúde específicas para diferentes etnias e grupos sociais, bem como a necessidade de uma caracterização da microbiota associada às mesmas, o presente estudo objetivou caracterizar a

ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em 30 crianças com idade de 3 a 7 anos da reserva indígena Umutina, Estado do Mato Grosso, bem como de 40 crianças não-índias na mesma faixa etária, além de determinar, através de PCR convencional e Real Time PCR, correlacionando com as condições periodontais das mesmas com as condições periodontais, socioeconômicas, de dieta e culturais.

Material e métodos

Todos os procedimentos clínicos e laboratoriais do presente estudo foram acompanhados e receberam a colaboração de alunos de doutorado e mestrado em Estomatologia além de estagiários da FOA-UNESP e colaboração de pesquisadores do Laboratório de Anaeróbios do ICB-USP e do corpo de saúde da FUNASA (médicos, dentistas e enfermeiros). O exame clínico e radiográfico da população indígena, bem como a coleta dos espécimes clínicos foram realizados por especialistas em Periodontia e Odontologia Preventiva previamente calibrados.

As amostras clínicas oriundas das crianças indígenas e não indígenas, mantidas em gelo, eram entregues no laboratório, juntamente com os dados referentes às condições periodontais e radiográficas dos pacientes examinados e fazia-se a extração do DNA microbiano, bem como a detecção do microrganismo alvo através do PCR convencional e do real-time PCR. As inter-relações entre os parâmetros sociais, clínico-radiográficos e microbiológicos foram determinadas com auxílio da Prof. Dra Christiane Marie Schweitzer, diretora do Núcleo de Tecnologia da Informação e docente do Centro de Matemática e Estatística-Universidade Federal do ABC.

A população estudada foi grupo amostral submetido à avaliação clínica, radiográfica, sócio-econômica e cultural foi constituído por 30 crianças indígenas, com idade de 3 a 7 anos, independentemente de gênero, e que não fizeram uso de antimicrobianos nos três meses que

precederam a coleta dos espécimes clínicos. As crianças não apresentavam histórico de miscigenação com não-índios e pertenciam às etnias Umutina, Paresi, Bororo, Bakairi, Kayabi, Irantxe, Nambikwara e Terena, que vivem na aldeia Umutina, Estado do Mato Grosso. Crianças que possuíam patologias sistêmicas ou necessidades especiais não participaram do estudo (HAFFAJEE et al., 2004). Para o grupo de 40 crianças não índias, foram utilizados os mesmos critérios de inclusão e exclusão descritos acima, sendo que as mesmas serão selecionadas em escolas da rede pública de ensino Araçatuba, São José do Rio Preto e região.

Baseado nos dados sobre a distribuição das condições socioeconômicas da população indígena estudada, se procurou compor o grupo de crianças não-indígenas de forma que o mesmo apresente condições equivalentes às apresentadas pelas famílias da reserva Umutina, guardadas as limitações de estudos comparativos dessa natureza, utilizando-se, para tanto de software de busca parametrizada desenvolvido pela Professora Dra. Christiane Marie Schweitzer.

Os pais e/ou responsáveis pelas crianças indígenas, bem como os líderes da comunidade, receberam instruções sobre a importância e objetivos do estudo, bem como as autoridades de saúde da FUNASA e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Assim, a seleção e o atendimento da comunidade foram realizados com o consentimento da população envolvida, anuência da FUNASA e do Conselho de Saúde da comunidade, o qual também informou as condições de saúde sistêmica e peculiaridades da população alvo.

No caso das crianças não índias, os pais e responsáveis receberam instruções semelhantes e somente participarão do estudo as crianças que consentirem e cujos pais autorizaram sua participação. Foram selecionadas crianças que, em função de local de

residência, aspectos socioeconômicos e culturais não estavam recebendo tratamento odontológico preventivo ou curativo.

Os exames clínicos da população indígena foram realizados entre meados de 2007 e fevereiro de 2008, enquanto as crianças não-índias foram selecionadas e examinadas no primeiro trimestre de 2008.

Inicialmente precedeu-se a anamnese, em formulários padronizados, constando a identificação do paciente, idade, aspectos étnicos, história da doença atual, histórias social, médica e familiar. Quando necessário, o antropólogo da aldeia colaborou no preenchimento dos formulários, juntamente com os profissionais de saúde envolvidos. A seguir, realizou-se o exame clínico intra e extra bucal.

Os exames clínicos periodontais foram realizados por um único examinador previamente treinado, utilizando-se os critérios do *Periodontal Screening and Recording* (PSR). O exame foi realizado com o uso de espelho bucal plano, pinça para algodão (Duflex^R), sondas periodontais milimetradas tipo Williams (Trinity^R) e sondas periodontais (Trinity^R), semelhantes às sondas número 621 da Organização Mundial de Saúde, recomendada pela American Dental Association e American Association of Periodontology.

Este último tipo de sonda apresenta uma esfera de 0,5 mm de diâmetro na sua ponta ativa, de particular importância para detecção de cálculo, evitando também o aprofundamento excessivo na bolsa periodontal. Os dados coletados eram registrados em ficha apropriada, segundo recomendação da ADA e AAP. Todos os pacientes e sadios receberam palestras individuais sobre instruções de higiene oral, seguindo a técnica de escovação preconizada por Bass, utilização de fio/fita dental e uso de escovas interdentais.

No exame periodontal complementar, foram considerados o índice sangramento gengival (AINAMO e BAY, 1975), presença de cálculo supragengival, determinação da profundidade clínica de sondagem e o nível clínico de inserção (RAMFJORD, 1959), índice

de higiene oral (O'LEARY et al., 1972), com utilização de verde de malaquita (2%, o qual não apresenta atividade antimicrobiana significativa).

As crianças não-índias foram examinadas de forma semelhante à descrita acima e foram encaminhadas para tratamento preventivo e curativo junto à Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP.

Os espécimes clínicos foram coletados de três sítios periodontais por paciente, que foram divididos em pacientes saudáveis, portadores de gengivite ou portadores de periodontite. A coleta dos espécimes do biofilme subgengival foi realizada após a remoção do biofilme supragengival (profilaxia dental). A coleta foi realizada por meio de cones de papel absorvente esterilizados, que eram introduzidos no interior dos sulcos gengivais (ou bolsas periodontais), onde permaneceram por 60 segundos (SLOTS, 1982; GAETTI-JARDIM JR. et al., 1996). Também foram coletados espécimes clínicos de saliva e biofilme supragengival, estes últimos com auxílio de curetas periodontais.

Todos os espécimes coletados foram transferidos imediatamente para criotubos contendo água ultrapura Milli-Q e mantidos em nitrogênio líquido. A seguir as amostras (oriundas da área indígena) foram enviadas, sob refrigeração (-196°C), por via aérea até a Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, para extração do DNA microbiano presente.

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água Milli Q foi extraído através do “kit” QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante e as concentrações dos DNA bacterianos foram determinadas em espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640), com leitura da absorbância ($A_{260\text{ nm}}$).

A detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pela amplificação do DNA por PCR convencional foi realizada empregando-se os iniciadores utilizados previamente por Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez.

A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10 X tampão PCR, 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 2,0 µl de dNTP (10 mM), 0,25 µl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM), 7 µl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 µl de DNA (ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Amplitherm, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); 35 ciclos de 94°C (1 min.), 60°C (1 min.), 72°C (1 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min.).

Em todas as reações foram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência do microrganismo estudado (Y4). Como controle de peso molecular foi utilizado o marcador 1 Kb DNA ladder (Gene Ruler™). Os produtos da amplificação pelo PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador com luz UV com câmara Kodak (Electrophoresis Documentation and Analyses System 120).

Na análise quantitativa por “Real-Time PCR” foram utilizadas seqüências baseadas nos genes da região 16SrRNA do genoma, específicas para os organismos em estudo (MAEDA et al., 2003). A sonda fluorescente que foi utilizada no sistema TaqMan é marcada no sentido 5' com 6-carboxifluoresceína (*reporter dye*) e no sentido 3' com 6-carboxitetrametilrodamina (*quencher dye*). A emissão fluorescente desse sistema TaqMan depende de uma sonda (equivalente a um terceiro iniciador) que anelava especificamente entre os dois iniciadores utilizados, o que torna o processo mais preciso e específico. Além desse aspecto, só há a detecção da amplificação quando existem sítios de anelamento tanto para o par de iniciadores como para a sonda.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µl, contendo de 1 X de Master Mixture TaqMan Universal (tampão PCR, dNTP, AmpliTaq Gold, sinal de referência interno, [6-carboxi-'x'-rodamina], uracil *N*-glicosidase-UNG, MgCl₂; Applied

Biosystem, Foster City, Calif), 900 nM de cada iniciador, 200 nM da sonda e 5 µl do DNA. As curvas-padrão foram construídas a partir de diluições conhecidas de DNA.

Essas reações de amplificação foram realizadas em aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Australia) programado para um ciclo a 94°C (10 min.), 40 ciclos a 95°C (15s.), 60°C (60s.), produzindo fragmentos aproximados de 1098 bp obtidos e comparados ao controle. A análise dos dados foi realizada com o programa incorporado no sistema de detecção. A linha “*threshold*” foi definida como aquela referente ao ciclo de amplificação em que a fluorescência emitida pela amostra mostrar-se superior à fluorescência de fundo da reação e será inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias do DNA alvo presentes no início do processo.

Em todos os testes de amplificação do DNA por PCR e real-time PCR serão utilizados controles positivos constituídos de DNA obtido das cepas de referência *A. actinomycetemcomitans* JP2 e ATCC 33384 e controle negativo, sem DNA.

Resultados

As amostras permitiram, através de estatísticas pontuais e intervalos de confiança, caracterizar as populações indígenas quanto aos parâmetros microbiológicos. Prevalência e análise de risco serão feitas utilizando-se as estatísticas de Cochran e Mantel-Haenszel para variáveis dicotômicas, ou teste de Qui-quadrado de Pearson para análise de proporções quando as variáveis possuírem três ou mais categorias. A presença ou ausência desse microrganismo foi avaliada através de ANOVA de resultados repetitivos. A inter-relação entre a ocorrência do microrganismo alvo e os parâmetros clínicos foi avaliada através do teste exato de Fisher. A análise estatística foi realizada no Centro de Matemática Computação e Cognição da Universidade Federal do ABC.

Os resultados obtidos com o PCR convencional apresentaram boa correlação com os dados do real-time PCR, sendo que a sensibilidade dos dois métodos se mostrou similar, embora para as amostras de indivíduos periodontalmente saudáveis o real-time PCR tenha se mostrado ligeiramente mais sensível, embora sem significância estatística (ANOVA de resultados repetitivos, $P= 0,061$).

A ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* entre crianças índias saudáveis e crianças não índias saudáveis foi significativamente diferente apenas para os resultados oriundos do sulco gengival, sendo que a modesta quantidade de amostras positivas obtidas a partir do biofilme supragengival e saliva desses pacientes não permite uma comparação estatística mais adequada. Por outro lado, nas crianças com gengivite, as que não viviam na reserva Umutina foram colonizadas por uma frequência muito mais elevada por esse microaerófilo, tendo sido encontrado em uma frequência mais elevada na saliva (teste de Mann-Whitney, $P= 0,047$), no biofilme supragengival (teste de Mann-Whitney, $P= 0,021$) e biofilme subgengival (teste de Mann-Whitney, $P= 0,006$), sendo que a ocorrência desse microrganismo mostrou correlação com o índice de placa (teste de Qui-quadrado, $P= 0,028$) e inflamação gengival (teste de Qui-quadrado, $P= 0,008$).

TABELAS 1 e 2

Além da ocorrência desse microrganismo, em termos qualitativos, como descrito nas tabelas 1 e 2, os dados da tabela 3 evidenciam que as populações desse microrganismo são muito mais elevadas nos espécimes positivos obtidos de crianças não índias (ANOVA, $P= 0,003$) e no biofilme subgengival, sendo que a contaminação salivar mostra refletir pobremente a população desse patógeno no biofilme (Índice de correlação -453, $P= 0,021$).

TABELA 3

Discussão

Dentre os principais microrganismos associados aos quadros infecciosos periodontais, merece destaque *A. actinomycetemcomitans*, freqüentemente ligado aos quadros mais agressivos dessas doenças (CORTELLI et al., 2005; GAETTI-JARDIM Jr. et al., 2006; LAFAURIE et al., 2007; CARVALHO et al., 2009), mas também implicado em infecções crônicas (TIMMERMAN et al., 2001; AVILA-CAMPOS & VELASQUEZ-MELELENDEZ, 2002; DOGAN et al., 2003; EBERSOLE et al., 2008).

A. actinomycetemcomitans merece destaque por ser um dos microrganismos bucais cuja distribuição apresenta notável influência das características étnicas e geográficas das populações envolvidas (RYLEV & KILIAN, 2008), tendo sido detectado em 35%-45% dos pacientes norte americanos com periodontite crônica (EBERSOLE et al., 2008; ANGELOV et al., 2009), de 52% a 90% dos brasileiros com essa condição periodontal (AVILA-CAMPOS & VELÁSQUEZ-MELELENDEZ, 2002; COLOMBO et al., 2005), 65,5% das pacientes grávidas norte-americanas com esse tipo de periodontite (PERSSON et al., 2008), de 76 a 93,5% dos pacientes tailandeses descritos por Hintao et al. (2007) e 86,4% dos mexicanos com periodontite (XIMENEZ-FYVIE et al., 2006), além de elevada prevalência na África do Norte (HAUBEK et al., 2008) e China (TONG et al., 2003; WU et al., 2007).

Contudo, Tanner et al. (2007) observaram esse microaerófilo em apenas pouco de mais de 20% das lesões iniciais de periodontite, enquanto Eguchi et al. (2008) detectaram-no em apenas 10,9% dos pacientes com abscesso periodontal, no Japão, e Lafaurie et al. (2007), em com diversas populações colombianas, verificaram a presença desse microaerófilo em aproximadamente 15%, 18%, 33%, 28% e 5% dos indivíduos com periodontite crônica localizada, generalizada, periodontite agressiva localizada, generalizada e em indivíduos saudáveis, respectivamente. Além desses grupos, uma baixa prevalência desse microaerófilo na Colômbia (BOTERO et al., 2007a; HERRERA et al., 2008), Holanda (BOUTAGA et al.,

2006) e Espanha (HERRERA et al., 2008) vem sendo relatada, com uma ocorrência sempre inferior a 20% em casos de periodontite e 10% na população saudável.

A ocorrência desse microrganismo para as crianças indígenas mostrou-se inferior a dados relativos a outras populações brasileiras, onde o mesmo foi detectado de 40,3 % dos saudáveis (GAETTI-JARDIM Jr. et al., 2006) e de 50% a 80% dos pacientes com periodontite crônica (TONG et al., 2003; COLOMBO et al., 2005, CORTELLI et al., 2005), sendo que esses dados foram semelhantes aos obtidos para crianças não índias.

Entretanto, a grande heterogeneidade da população brasileira pode dificultar comparações entre os resultados obtidos com as crianças não índias e dados oriundos de outras áreas geográficas visto que a denominação “não índio” não traz em si mesma nenhuma característica do ponto de vista racial e é muito provável que parcela significativa dessas crianças tenha DNA mitocondrial tipicamente americano, enquanto os meninos teriam cromossomo Y tipicamente europeu ou ibérico, uma vez que a colonização do nosso país claramente evidencia o europeu mediterrâneo como pai e a índia e a mulher negra, escrava ou não, como as mães dessa população essencialmente mestiça.

Essa predileção racial desse microrganismo pode refletir os diferentes mecanismos de transmissão a que ele está sujeito e principalmente o processo de formação do povo brasileiro, como descrito sucintamente acima. Contudo, essa heterogeneidade de distribuição em diferentes populações humanas também pode estar associada à virulência dos vários sorotipos e genótipos dessa espécie, que condicionam o tipo de interação que as mesmas estabelecem com o hospedeiro (THIHA et al., 2007; HAUBEK et al., 2008), bem como com o fato de que essa espécie bacteriana parece evoluir principalmente através do acúmulo de mutações e menos devido à recombinação genética, o que tornaria os diferentes sorotipos verdadeiras subpopulações geneticamente isoladas cuja disseminação estaria intimamente ligada ao

destino das populações humanas portadoras (HAUBEK et al., 2008; RYLEV & KILIAN, 2008).

O papel de *A. actinomycetemcomitans* nas doenças periodontais necessita ser mais bem avaliado, visto ter se mostrado bastante comum no biofilme sub e supra gengival de algumas populações (DAHLÉN & LEONHARDT, 2006; HINTAO et al., 2007) e mais raro ou ausente em populações autóctones da América do Sul e América Central, (IDE et al., 2000; DOWSETT et al., 2002). Alguns estudos mostram que, em certas populações, a ocorrência desse cocobacilo parece não afetar a saúde periodontal e sua distribuição pode ser ainda mais elevada em indivíduos sadios (MAYANAGI et al., 2004; DAHLÉN & LEONHARDT, 2006). Possivelmente essa heterogeneidade esteja associada à virulência dos vários sorotipos e clones que constituem essa espécie (THIHA et al., 2007; HAUBEK et al., 2008; CARVALHO et al., 2009), onde, na população brasileira não índia, o sorotipo B estaria mais associado às formas mais agressivas de periodontite e o sorotipo A colonizaria os indivíduos sadios (CARVALHO et al., 2009).

Assim concluímos que a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* foi significativamente mais elevada em crianças brasileiras não índias do que nas crianças índias e esse microrganismo mostrou correlação com o índice de placa e inflamação gengival na população alvo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Prof. Dra. Christiane Marie Schweitzer pela assistência ao estudo. Esse estudo foi subsidiado pela Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Proc. 2007/51016-3

Referências

1. Ainamo, J. and Bay, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int. Dent. J.*, **25**: 229-235, 1975.
2. Angelov, N. et al. Recovery of putative pathogens from paper point sampling at different depths of periodontal lesions. *Clin. Cosm. Invest. Dent.*, **1**: 1-5, 2009.
3. Arantes, R.; Santos, R.V. and Coimbra JR, C. E. A. Saúde bucal na população indígena Xavante de Pimentel Barbosa, Mato Grosso, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, **17**: 375-384, 2001.
4. Avila-Campos, M. J. and Velasquez-Melendez, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **44**: 1-5, 2002.
5. Bjelland, S. et al. Dentists, diabetes and periodontitis. *Aust. Dent. J.*, **47**, 202-207, 2002
6. Botero, J. E. et al. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J. Periodontol.*, **78**: 696-704, 2007.
7. Boutaga, K. et al. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J. Clin. Periodontol.*, **33**: 427-433, 2006.
8. Campbell, D. et al. Improving oral health of Alaska natives. *Amer. J. Pub. Health*, **95**: 1880, 2005.
9. Carvalho, R. P. M. et al. Relationship of neutrophil phagocytosis and oxidative burst with the subgingival microbiota of generalized aggressive periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, **24**: 124-132, 2009.
10. Colombo, A. P. V. et al. Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9 month results. *J. Periodontol.*, **76**: 778-784, 2005.

11. Cortelli, J. R. et al. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, **32**: 860-866, 2005.
12. Coutinho, T. C. L. and Tostes, M. A. A. Prevalência de gengivite em crianças. *RGO*, **45**: 170-174, 1997.
13. Dahlén, G. and Leonhardt, A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol. Immunol.*, **21**: 6-11, 2006.
14. Dogan, B. et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J. Periodontol.*, **74**: 803-814, 2003.
15. Dowsett, S. A.; Eckert, G. J. and Kowolik, M. J. Comparison of periodontal disease status of adults in two untreated indigenous population of Guatemala, Central America. *J. Clin. Periodontol.*, **29**: 784-787, 2002.
16. Ebersole, J. L. et al. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in hispanic Americans with type 2 diabetes. *J. Periodontol.*, **79**: 637-646, 2008.
17. Eguchi, T. et al. Microbial changes in patients with acute periodontal abscess after treatment detected by Pado Test. *Oral Dis.*, **14**: 180-184, 2008.
18. Feng, Z. and Weinberg, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology 2000*, **40**: 50-76, 2006.
19. Gaetti-Jardim JR, E. **Fatores envolvidos na virulência de *Fusobacterium nucleatum* isolados de primatas humanos e não humanos. Estudo comparativo.** 1997. 127 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
20. Gaetti-Jardim JR, E., Zelante, F. and Avila-Campos, M. J. Oral species of *Fusobacterium* from human and environmental samples. *J. Dent.*, **24**: 345-348, 1996.

21. Gaetti-Jardim JR., E et al. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects, and children with gingivitis in two cities of the State of São Paulo, Brazil. *J. Appl. Oral Sci.*, **14**: 153-156, 2006.
22. Haffajee , A. D. et al. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J. Clin. Periodontol.*, **31**: 996-1002, 2004.
23. Haubek, D. et al. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*, **371**: 237-242, 2008.
24. Herrera, D. et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J. Clin. Periodontol.*, **35**: 106-113, 2008.
25. Hintao, J. et al. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol. Immunol.*, **22**: 175-181, 2007.
26. Ide, L. et al. Occurrence of seven putative periodontal pathogens in the subgingival plaque of two native populations in the Xingu Indian park. *Anaerobe*, **6**: 135-137, 2000.
27. Kuboniwa, M. et al. Quantitative detections of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol. Immunol.*, **19** : 168-176, 2004.
28. Lafaurie, G. I. et al. Demographic, clinical and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J. Periodontol.*, **78**: 629-639, 2007.

29. Leung, W. K. et al. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from young Chinese aggressive periodontitis patients. *J. Periodontal Res.*, **40**: 258-268, 2005.
30. Maeda, H. et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **39**: 81-86, 2003.
31. Mayanagi, G. et al. Detection frequency of periodontitis associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol. Immunol.*, **19**: 379-385, 2004.
32. Miura, M. et al. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* genotypes in patients with aggressive periodontitis. *J. Periodontal Res.*, **40**: 147-154, 2005.
33. O'leary, T. J., Drake, R. B. and NAYLOR, J. E. The plaque control record. *J. Periodontol.*, **43**: 38-56, 1972.
34. Paula, M. O., Gaetti-Jardim JR., E. and Avila-Campos, M. J. Plasmid profile in oral *Fusobacterium nucleatum* from humans and *Cebus apella* monkeys. *Rev. Inst. Méd. Trop. de São Paulo*, **45**: 5-9, 2003.
35. Persson, G. R. et al. *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in subgingival bacterial samples from parous women. **J. Periodontol.**, v. 79, p. 508-516, 2008.
36. Ramfjord, S. P. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. *J. Periodontol.*, **30**: 51-59, 1959.
37. Ronderos M., Bruce L. Hodges, J. S. Periodontal disease among indigenous people in the Amazon rain forest. *J. Clin. Periodontol.*, **28**: 995–1003, 2001.

38. Rosalem junior, W. et al. Analysis of leukotoxin gene types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Brazilians with aggressive periodontitis. *Braz. J. Microbiol.*, **37**: 127-134, 2006.
39. Rylev, M. and Kilian, M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J. Clin. Periodontol.*, **35**: 346-361, 2008.
40. Sanz, M. et al. 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.*, **31**: 1034-1047, 2004.
41. Saygun, I., Kubar, A.; Özdemir, A. and Slots, J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *J. Periodont. Res.*, **40**: 187-191, 2005.
42. Skrepcinski, F. B. and Niendorff, W. J. Periodontal disease in american indians and Alaska natives. *J. Public Health Dent.*, **60**: 261-266, 2000.
43. Slots, J. Salient biochemical characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Arch. Microbiol.*, **131**, 60-67, 1982.
44. Tanner, A. C. R. et al. Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults. *J. Clin. Periodontol.*, **34**, 917-930, 2007.
45. Thiha, K. et al. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.*, **22**: 201-207, 2007.
46. Timmerman, M. F. et al. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, **28**: 617-627, 2001.

47. Tong, K. S. K. et al. Clinical responses to mechanical periodontal treatment in Chinese chronic periodontitis patients with and without *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.*, **74**: 1582-1588, 2003.
48. Wu, Y. M. et al. Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. *J. Zhejiang Univ. Sci B.*, **8**: 121-131, 2007.
49. Xavier, A. S. S. et al. Condições gengivais de crianças com idade entre 6 e 12 anos: aspectos clínicos e microbiológicos. *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integrad, João Pessoa.*, **7**: 29-35, 2007.
50. Ximenez-Fyvie, L. A. et al. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J. Periodontol.*, **77**: 460-471, 2006.
51. Yamaura, M., Sato, T., Echigo, S. and Takahashi, N. Quantification and detection of bacteria from postoperative maxillary cyst by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.*, **20**: 333-338, 2005.
52. Yang, H-W et al. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur. J. Oral Sci.*, **113**: 28-35, 2005.

TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva, biofilme supra e subgengival de crianças indígenas e não indígenas com diferentes condições de saúde periodontal. Dados obtidos por PCR.

Amostra clínica	Pacientes estudados			
	CIPS ¹ N=11	CIG ² N=19	CNIPS ³ N=23	CNIG ⁴ N=17
Saliva	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,35)	3 (17,65)*
Biofilme supragengival	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (17,39)	8 (47,06)*
Biofilme subgengival	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (30,43)*	10 (58,82)*

¹Crianças índias periodontalmente saudáveis

²Crianças índias com gengivite

³Crianças não índias periodontalmente saudáveis

⁴Crianças não índias com gengivite

Tabela 2. Ocorrência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva, biofilme supra e subgengival de crianças indígenas e não indígenas com diferentes condições de saúde periodontal. Dados obtidos por real-time PCR.

Amostra clínica	Pacientes estudados			
	CIPS ¹ N=11	CIG ² N=19	CNIPS ³ N=23	CNIG ⁴ N=17
Saliva	0 (0,0)	1 (5,26)	1 (4,35)	5 (29,41)*
Biofilme supragengival	0 (0,0)	1 (5,26)	3 (13,04)	10 (58,82)*
Biofilme subgengival	0 (0,0)	1 (5,26)	9 (39,13)*	10 (58,82)*

¹Crianças índias periodontalmente saudáveis

²Crianças índias com gengivite

³Crianças não índias periodontalmente saudáveis

⁴Crianças não índias com gengivite

Tabela 3. Populações de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na saliva, biofilme supra e subgingival de crianças indígenas e não indígenas com diferentes condições de saúde periodontal. Dados Obtidos por real-time PCR.

Amostra clínica	Cópias de DNA alvo nas amostras média ± desvio padrão			
	CIPS ¹	CIG ²	CNIPS ³	CNIG ⁴
Saliva	ND	1,46. 10	1,32 .10 ²	1,23 .10 ³ ± 0,88 .10 ³
Biofilme supragingival	ND	1,8 .10 ³	3,1 .10 ² ± 0,37 .10 ²	8,3 .10 ³ ± 1,9 .10 ³
Biofilme subgingival	ND ⁵	3,11 .10 ²	4,22 .10 ³ ± 1,18 .10 ³	2,82 .10 ⁴ ± 0,67 .10 ⁴

¹Crianças índias periodontalmente saudáveis

²Crianças índias com gengivite

³Crianças não índias periodontalmente saudáveis

⁴Crianças não índias com gengivite

⁵ND: não detectado

Anexo c – Normas da revista a ser publicado

Submission of Manuscripts

Manuscripts should be in concise English and be typed (double line spacing) on one side of the paper only with at least 30 mm margins all round and on International A4 or quarto paper. One original and three copies should be submitted to the Editor. An additional copy of typescript should be provided on computer diskette. Three sets of photographs to be good quality should be submitted. The word processor program and version used, and the type of computer employed are indicated on the floppy disk. The author should retain a copy of the manuscript. Initial receipt of all manuscripts submitted will be acknowledged and, at the conclusion of the review procedure, authors will be notified of (1) acceptance, (2) need for revision, or (3) rejection of their papers by the Editor-in-chief after reviewing by at least two referees.

Title page. The title page should bear: 1. Title, which should be concise as well as descriptive; 2. Full name of each author; 3. Name and full address of department, hospital or institution to which work should be attributed; 4. Running title of up to 50 characters; 5. Name, address of author responsible for correspondence, a fax number and an e-mail address.

Text. Papers should normally be divided into an

Abstract (about 250 words) and Key words up to five words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, Tables and Figures. Number all pages consecutively in the middle of the bottom. The author should mark in the right-hand margin where figures and tables may be inserted. Tables should be numbered consecutively in Arabic numerals, with a brief title and be on a separate sheet. Figures, charts and graphs must be professionally drawn in black ink. They should preferably be drawn approximately double the intended printed size. Numbering should be in Arabic numerals. Photographs must be clear, sharp, glossy prints usually 8.1×11.6 cm but no larger than 20.3×25.4. Figure legends must be typed on a separate page at the end of the manuscript. If photographs of patients are used, either the subjects should not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the figure. A label on the back of each photograph should give the illustration number, name of the author and indicate the top of the figure. Authors will be charged for the extra cost of color illustrations.

In general, authors should use S.I. units (see The International System of Units (SI), Eds. D.T. Goldman and R.J. Bell, NBS Special Publication 330, 1981).

The complete names of individual teeth must be given in full in the text of articles (e.g., “Permanent upper right first molar”). In Tables, these names may be abbreviated by Viohl’s Two-digit System.

References. References must be double spaced and are to be numbered consecutively as they appear in the text of the paper. When authors are multiple, all the names should be listed. Sample references are illustrated below. The citation of articles written in Japanese should be minimal and put “in Japanese” at the end of reference.

1) Alaluusua, S., Takei, T., Ooshima, T. and Hamada, S.: Mutacin activity of strains isolated from children with varying levels of mutans streptococci and caries. *Arch Oral Biol* **36**: 251–255, 1991.

2) Gaunt, W., Osborn, J.W. and ten Cate, A.R.: *Advances in Dental Histology*. John Wright and Sons, Bristol, 1967, p.94.

3) Swarts, M.L. and Phillips, R.W.: *In vitro* studies on the marginal leakage of restorative materials. *JADA* **62**: 141–151, 1961.

References to government publications should include the department, bureau or office, title, location of publisher, publisher, year, pages cited, and, most important, the publication series, report or monograph number.

4) The health consequences of smoking (DHEW) Publication No. HSM73-8704. Government Printing Office, Washington, DC, 1973.

The manuscript. In the case of authors who are not native speakers of English, the manuscripts should be checked and corrected by a native English speaking person. Manuscripts may be returned without review or rejected on the basis of poor English or inappropriate style. Manuscripts should be original work not previously published or being considered for publication elsewhere.

Manuscripts submitted for publication should have been performed in accordance with the ethical standards and must contain a statement to the effect that all human studies have been examined by the appropriate ethics committee. The manuscript should be accompanied by a covering letter from the author who will be responsible for correspondence arising from the publication. The covering letter should state that the manuscript has been approved by all authors and is solely the work of the author(s) named. Include copies of permission to reproduce published material or to use illustrations that may identify subjects. The Editor reserves the right to edit the manuscripts.

Reprints. Quantities of reprints can be purchased by the author(s). A reprint order form will be sent with author's page proofs prior to publication. No free reprints will be given to authors. The completed purchase order form should be sent to the Journal with the corrected page proofs.

The Submission Deadlines. The deadline for the submission of manuscripts are 30th September and 31st March.