

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela**

**Prevalência de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*,  
*Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em  
diferentes sítios da boca detectados por PCR**

**Goiânia**

**2007**

**Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela**

**Prevalência de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*,  
*Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em  
diferentes sítios da boca detectados por PCR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de **Doutora em Biologia Celular e Molecular**.  
Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Estrela

**Co-Orientadora:** Profa. Dra. Fabiana Cristina Pimenta

**Goiânia  
2007**

**Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela**

**Prevalência de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*,  
*Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em  
diferentes sítios da boca detectados por PCR**

Prof. Dr. Carlos Estrela – FO-UFG  
Presidente da Banca

Profa. Dra. Ana Helena Gonçalves de Alencar – FO-UFG

Profa. Dra. Fabiana Cristina Pimenta – IPTSP-UFG

Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais – ICB-UFG

Prof. Dr. Gilson Blitzkow Sidney – FO-UFPR



**PENSAMENTO**

*“Não existe alguém que nunca teve um professor na vida, assim como não há ninguém que nunca tenha tido um aluno.*

*Se existem analfabetos, provavelmente não é por vontade dos professores. Se existem letrados, é porque um dia tiveram seus professores.*

*Se existe Prêmio Nobel, é porque alunos superaram seus professores. Se existem sábios, é porque transcenderam suas funções de professores. Quanto mais se aprende, mais se quer ensinar. Quanto mais se ensina, mais se quer aprender.”*

*Içami Tiba*



## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus filhos, Lucas, Matheus, Maria Cristina e Pedro e ao meu esposo, amigo e companheiro, Carlos, pelo amor incondicional, carinho e compreensão nos momentos de ausência. Obrigada por entenderem e jamais duvidarem do meu potencial, contribuindo para a realização deste ideal. A vocês, o fruto deste amor e minha realização pessoal e profissional.*



## **AGRADECIMENTOS**



Em primeiro lugar agradeço a Deus por esta oportunidade a mim concedida. Agradeço também a ajuda de nossos queridos Irmãos de Luz que sempre me inspiraram confiança e perseverança para vencer obstáculos e prosseguir confiante no sucesso, sempre...

Ao meu Orientador, esposo e amigo Carlos Estrela, meus sinceros agradecimentos pela dedicação e incentivo constantes, paciência, honestidade e compreensão, sempre me ajudando a alcançar os meus objetivos.

Aos meus filhos Lucas, Matheus, Maria Cristina e Pedro, os meus agradecimentos eternos pela compreensão da ausência e incentivo constante para a realização deste ideal.

Aos meus pais, João e Maria Ilma e minhas irmãs, Denise e Flávia. Obrigada por minha formação pessoal.

À Professora Dra. Fabiana Cristina Pimenta pela prestatividade, incentivo, disposição em me auxiliar, paciência, dedicação e disponibilização do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTESP – para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Lili Lueschke Bammann, obrigada pelo auxílio constante, pelo exemplo de perseverança e ética. Muito obrigada por ter a Senhora como amiga e orientadora.

À Professora Dra. Denise Spolidorio meus agradecimentos por ter me recebido e apresentado este mundo maravilhoso da Biologia Molecular.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Naldi Ruiz, coordenador do curso de especialização em periodontia da ABO-GO, pela atenção e auxílio, com a permissão da execução de parte deste trabalho.

Aos amigos. Aleimar Moraes Toledo, Daniel Almeida Decurcio, Júlio Almeida Silva, Orcelo Vítor Siqueira César e Orlando Aguirre Guedes pelo auxílio e amizade.

Ao Professor Dr. Luiz Artur Mendes Bataus, pela coerência e dedicação na condução do curso de pós-graduação.

À Professora Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia Morais por toda atenção e presteza durante o doutorado.

À Professora Dra. Ana Helena Gonçalves de Alencar por toda contribuição e atenção especial durante o exame de qualificação.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do ICB-UFG, por compartilhar os ensinamentos e posturas, pela amizade e exemplo de conduta profissional.

Ao Professor Dr. Cleômenes Reis pela dedicação e exemplo. Obrigada por tê-lo como orientador durante o curso de mestrado em microbiologia.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação e do laboratório de microbiologia do IPTSP-UFG pela receptividade, convivência e compreensão.

Aos pacientes que atenciosamente se dispuseram a participar deste estudo.

Finalmente, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o alcance deste degrau científico.

A todos, MUITO OBRIGADA!



## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**Gráfico 1.** Prevalência (%) de *S. mutans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* na saliva, no dorso da língua, na mucosa jugal, na placa supra e subgingival.

55



## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b>	Prevalência de <i>S. mutans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. gingivalis</i> e <i>P. intermedia</i> na saliva e em diferentes sítios da boca.	<b>54</b>
<b>Tabela 2A-C</b>	Distribuição de <i>S. mutans</i> na saliva e em diferentes sítios da boca.	<b>93</b>
<b>Tabela 3A-C</b>	Distribuição de <i>E. faecalis</i> na saliva e em diferentes sítios da boca.	<b>96</b>
<b>Tabela 4A-C</b>	Distribuição de <i>P. gingivalis</i> na saliva e em diferentes sítios da boca.	<b>99</b>
<b>Tabela 5A-C</b>	Distribuição de <i>P. intermedia</i> na saliva e em diferentes sítios da boca.	<b>102</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATCC	American type culture collection
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Oligonucleotídeos
dNTP Mix	Mistura de oligonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
g	Gramas
Mix	Mistura de reagentes específicos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
PBS	Tampão fosfato de Sorensen
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMNs	Polimorfonucleares
TBE	Tris- borato-EDTA
ufc	Unidades formadoras de colônias





**RESUMO**

Estudou-se a prevalência de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em 30 pacientes portadores de periodontite crônica. Para tanto foram coletadas amostras de saliva e de diferentes sítios da boca: dorso da língua, mucosa jugal, placa bacteriana supragengival e placa bacteriana subgengival. Posterior à extração do DNA, as amostras foram submetidas à técnica de PCR. Para o *S. mutans* e o *E. faecalis* empregou-se o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, e 36 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto, sendo a reação finalizada a 72°C por 10 minutos. Para a *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram empregados 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento dos oligonucleotídeos a 56°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 2 minutos, sendo a reação finalizada a 72°C por 10 minutos. Os resultados obtidos mostraram a prevalência do *S. mutans* em 70% das amostras de saliva, 60% das amostras de raspados de dorso da língua, 50% das amostras coletadas na mucosa jugal, 56,66% na placa supragengival e 53,33% na placa subgengival. A prevalência de *E. faecalis* foi igual a 3,33% nas amostras de saliva, 13,33% nas amostras de raspados de dorso da língua, 3,33% nas amostras coletadas na mucosa jugal, 6,66% na placa supragengival e 6,66% na placa subgengival. A *P. gingivalis* apresentou prevalência de 23,33% nas amostras de saliva e dorso da língua, 30% nas amostras coletadas na mucosa jugal, 40% na placa supragengival e 53,33% na placa subgengival. Para a *P. intermedia* verificou-se prevalência em 23,33% das amostras de saliva, 33,33% das amostras coletadas na superfície dorsal da língua, 26,66% na mucosa jugal, 33,33% na placa supragengival e 30% na placa subgengival. Todas as bactérias estudadas foram identificadas nos pacientes com periodontite crônica, na saliva e sítios analisados. O

*S. mutans* apresentou maior prevalência em todos os microambientes, seguido pela *P. gingivalis* e *P. intermedia*. O *E. faecalis* foi observado em pequena prevalência. Não houve diferença estatística significativa entre a saliva e os demais sítos estudados.

Palavras-Chave: *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, microbiota bucal, periodontite crônica, PCR.



**ABSTRACT**

The aim of this work was to identify *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* and to determine their prevalence in 30 patients with chronic periodontitis. Samples of saliva and from different buccal tissues: tongue dorsum, buccal mucosa, supragingival and subgingival plaques were collected. After DNA extraction the samples were analyzed using multiplex PCR. For *S. mutans* and *E. faecalis* it was employed the following cycling parameters: initial denaturation step at 95°C for 5 minutes, followed by 36 cycles of a denaturation step at 95°C for 30 seconds; a primer-annealing step at 60°C for 1 minute; an extension step at 72°C for 1 minute; and a final step at 72°C for 10 minutes. For *P. gingivalis* and *P. intermedia* it was employed the following cycling parameters: initial denaturation step at 94°C for 5 minutes, followed by 36 cycles of a denaturation step at 94°C for 1 minute; a primer-annealing step at 56°C for 1 minute; an extension step at 72°C for 2 minutes; and a final step at 72°C for 10 minutes. The results showed the prevalence of *S. mutans* in 70% of the saliva samples; 60% of the samples collected from the tongue dorsum; 50% of the samples collected on the buccal mucosa; 56,66% in the supragingival plaques and 53,33% in the subgingival plaques. The prevalence of *E. faecalis* was 3,33% in the saliva samples; 13,33% in the samples collected from the tongue dorsum; 3,33% in the samples collected on the buccal mucosa; 6,66% in the supragingival plaque and 6,66% in the subgingival plaque. *P. gingivalis* presented the prevalence of 23,33% in the saliva samples and for the samples collected in the tongue dorsum; 30% in the samples collected on the buccal mucosa; 40% in the supragingival plaque and 53,33% in the subgingival plaque. For *P. intermedia* it was observed a prevalence of 23,33% in the saliva samples; 33,33% in the samples collected from the tongue dorsum; 26,66% in the samples collected on the buccal mucosa; 33,33% in the supragingival plaque and

30% in the subgingival plaques. All the microorganisms analyzed in this study were identified in the patients with chronic periodontitis, in saliva and in the other sites of sample collection. *S. mutans* showed the higher prevalence in all the microenvironments, followed by *P. gingivalis* and *P. intermedia*. *E. faecalis* was observed in low prevalence. There was no significant statistical difference between saliva and the other places of sample collection.

Keywords: *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, oral microorganisms, chronic periodontitis, PCR.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>14</b>
<b>RESUMO</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>2. RETROSPECTIVA DA LITERATURA</b>	<b>28</b>
<b>3. PROPOSIÇÃO</b>	<b>43</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>45</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>93</b>



## **1. INTRODUÇÃO**



A boca apresenta uma microbiota complexa, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo. Foram identificadas mais de 700 espécies de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e vírus (BAMMANN & ESTRELA, 2004; PASTER et al., 2001; KOLENBRANDER et al., 2006 ).

A distribuição dos microrganismos pode ser observada em quatro principais ecossistemas bucais: epitélio bucal, dorso da língua, superfície dentária supragengival e superfície dentária e epitelial subgengival. A saliva por estar em contato com os tecidos bucais também pode apresentar estas células provenientes de diferentes sítios da boca (SHEARER, 1996; SPRATT & PRATTEN, 2003). Estas células microbianas podem estabelecer relações entre si e com o hospedeiro (MAGER et al., 2003).

O hospedeiro e os microrganismos bucais mantêm adequadas relações ecológicas. Portanto, estabelecem uma relação de anfibiose, benéfica para ambos. Quando esta relação é alterada para antibiose, há a ocorrência de algum tipo de desequilíbrio. Esta é uma característica comum em muitas doenças infecciosas. Uma espécie patogênica pode colonizar um hospedeiro sem que o mesmo manifeste aspectos clínicos da doença durante determinado período de tempo (BAMMANN & ESTRELA, 2004).

A microbiota que coloniza a boca ao interagir e se adaptar pode formar biofilmes com diferentes complexidades de acordo com as características microbianas. Os biofilmes proporcionam um ambiente de proteção aos microrganismos colonizadores e permitem o estabelecimento de cadeias metabólicas que não seriam possíveis se as espécies estivessem planctônicas (livres). O biofilme é propício para a sobrevivência microbiana e inibe a resposta do hospedeiro. Um dos maiores

paradigmas da última década foi o reconhecimento e aceitação de que a placa dental é um biofilme com características semelhantes às daquelas de biofilmes que ocorrem em outros locais da natureza. A partir deste reconhecimento as pesquisas deixaram de ter como alvo as culturas puras e o direcionamento foi o estudo de espécies microbianas que existem em comunidades (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2006).

Socransky & Haffajee (1992) classificaram os microrganismos como patógenos em potencial ou não. Assim, para que um microrganismo possa ser considerado patógeno, este deve estar associado a uma doença; ser evidenciado em número elevado nos sítios doentes; estar ausente ou reduzido nos sítios que demonstrem resolução clínica; induzir resposta do hospedeiro na forma de uma alteração celular ou resposta imune humoral; ser capaz de causar doença em modelos de animais experimentais; demonstrar fatores de virulência responsáveis por permitir ao microrganismo causar destruição dos tecidos do hospedeiro.

Várias doenças da boca foram identificadas (NEVILLE et al., 2002). Todavia, dentre estas nota-se a prevalência da cárie dental, das doenças periodontais e das infecções endodônticas.

A cárie dental é considerada uma doença infectocontagiosa, caracterizada por solubilizar os minerais da dentina, a partir de ácidos orgânicos oriundos do metabolismo bacteriano dos carboidratos fermentáveis da dieta, desnaturando seu colágeno e selecionando microrganismos capazes de sobreviver e crescer em condições ácidas e metabolizar o colágeno desnaturado. Desta maneira, o hospedeiro suscetível, a microbiota específica e a dieta cariogênica representam fatores importantes e imprescindíveis na etiologia do processo de cárie dental. Entre os principais microrganismos, que aumentados em número na placa

microbiana levam ao surgimento de cárie dentária, destacam-se o *Streptococcus mutans*, o *Lactobacilos sp.* e o *Actinomyces sp.* (LOESCHE, 1993).

Um dos maiores destaques dentre os agentes agressores da polpa dentária são os microrganismos responsáveis pelo processo da cárie dental. Pode-se observar duas situações distintas quanto ao tipo de infecção endodôntica. Infecções primárias (iniciais) aparecem em necroses pulpares não submetidas a tratamento (com ou sem rarefação periapical). Caracterizam-se por apresentar uma infecção polimicrobiana com bactérias anaeróbias Gram-negativas. Infecções secundárias ocorrem em dentes submetidos a tratamentos endodônticos associados a insucessos. Observa-se neste caso o predomínio de bactérias facultativas Gram-positivas (NAIR, 2004). Dentre os diversos microrganismos que compõe a microbiota endodôntica, o *E. faecalis* se mostrou potencialmente importante nas infecções endodônticas (SUNDQVIST et al., 1998).

As doenças periodontais podem ser classificadas em gengivite, periodontite crônica, periodontite agressiva, doença periodontal necrosante e abscesso periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a). A periodontite crônica, segundo a Academia Americana de Periodontia, pode ser definida como uma inflamação gengival que se estende aos tecidos de suporte adjacentes. A doença é caracterizada pela perda de inserção devido à destruição do ligamento periodontal e dos tecidos ósseos de suporte (PERSON, 2005). Na doença periodontal foi identificada uma associação entre espécies bacterianas. Para a placa subgengival estes microrganismos foram agrupados em complexos de acordo com a evolução da doença (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a,b).

Considerando a importância do papel das bactérias em freqüentes doenças que ocorrem na boca, a identificação e a análise de prevalência de

espécies de elevado potencial de patogenicidade parecem oportunas e justificáveis ao atual momento do conhecimento.



## **2. RETROSPECTIVA DA LITERATURA**

Os agentes etiológicos das infecções bucais começaram a ser investigados na “Idade de Ouro da Microbiologia” (1857-1910). Neste período, avanços surpreendentes ocorreram liderados, principalmente, por Louis Pasteur e Robert Koch, como o estabelecimento dos agentes de muitas doenças e o papel da imunidade na prevenção e cura de doenças, o que permitiu que a microbiologia fosse considerada uma ciência. Os postulados de Koch apresentam, ainda hoje, grande relevância para o estudo da etiologia de qualquer doença infecciosa: 1 – o mesmo patógeno deve estar presente em todos os casos da doença; 2 – o patógeno deve ser isolado do hospedeiro doente e crescer em cultura pura; 3 – o patógeno da cultura pura deve promover a doença quando inoculado em um animal de laboratório saudável e suscetível; 4 – o patógeno deve ser isolado do animal inoculado, sendo necessário demonstrar que ele é o microrganismo inicial (TORTORA et al., 2005).

A microbiologia oral teve um destaque a partir de 1890 com a publicação do trabalho intitulado “Os Microrganismos da cavidade oral humana”, de autoria de um discípulo de Koch, Willoughby D. Miller, considerado atualmente o pai da microbiologia oral humana (NISENGARD & NEWMAN, 1994).

Com os avanços nas técnicas de cultivo de microrganismos e de microscopia, ocorridos no século XX, verificou-se o aperfeiçoamento da técnica microbiológica, de procedimentos assépticos de coleta, de métodos para transporte capazes de manter viáveis as células microbianas, de meios de cultura enriquecidos e de técnicas de manipulação em condições de anaerobiose. Estas descobertas favoreceram a identificação de microrganismos bucais (BAMMANN & ESTRELA, 2004).

A saliva é um fluido corporal que mantém contato com toda a superfície bucal. Suas características influenciam a microbiota, à medida que pode aumentar

ou reduzir a capacidade de sobrevivência da mesma. Na saliva se verificou a presença de proteínas ricas em prolina, mucinas, antígenos, imunoglobulinas, além de glicoproteínas (albumina, lisozima, amilase, fosfoproteínas ricas em cisteína, imunoglobulina A, lactoferrina). Algumas destas proteínas favorecem a ligação de microrganismos à superfície dentária, podendo funcionar como receptores de ligação (SLOTS & RAMS, 1992a, b). Pode-se citar também a potencial fonte primária de nutrientes para as bactérias; a promoção da agregação de células microbianas, além de inibição da multiplicação de alguns microrganismos exógenos, através dos componentes de defesa do hospedeiro. Na saliva encontra-se de  $10^8$  –  $10^9$  microrganismos viáveis/mL, oriundos dos dentes e mucosa bucal, principalmente da língua (SCHONFELD, 1992; MARSH, 2000).

Os dentes, ao contrário de outras superfícies do organismo apresentam uma superfície dura, não descamativa, que favorece o desenvolvimento de grandes depósitos microbianos. Em  $1\text{mm}^3$  de placa dental estão presentes mais de  $10^8$  bactérias (LOESCHE, 1993). Apesar de mais de 700 espécies bacterianas terem sido isoladas e caracterizadas na placa dental, ainda não foi possível identificar todas as bactérias. Dentre os microrganismos mais freqüentes da placa bacteriana dental estão os espiroquetas, fusiformes e estreptococos. Observa-se como expressivo destaque os seguintes microrganismos: *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythensis*), *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* (SLOTS & RAMS, 1992a; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a, b).

A cárie dental e a doença periodontal têm sido destacadas como doenças que comprometem os tecidos da boca. Observa-se assim uma variedade de espécies microbianas de expressiva relevância. Contudo, algumas espécies se

destacaram entre as demais, particularmente considerando como fatores de risco a virulência bacteriana e características genotípicas e fenotípicas.

A cárie dental é uma doença multifatorial com fatores genéticos, ambientais, dietéticos e bacterianos. Um considerável número de estudos evidenciou uma associação significativa do *Streptococcus mutans* com a cárie dental humana. Quando a cárie é diagnosticada observa-se uma elevada concentração do *S. mutans*. Esta bactéria tem sido muito estudada, considerando vários enfoques de questionamentos e valendo-se de diferentes técnicas para sua detecção (CURTISS, 1985; LOESCHE, 1986, 1993; KOHLER & KRASSE, 1988; CAUFIELD & WALKER, 1989; BANAS et al., 1990; MAIDEN et al., 1992; KURAMITSU et al., 1995; KURAMITSU & ELLEN, 2000; OHO et al., 2000; OTA et al., 2006; NAPIMOGA et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2006).

Os estreptococos da boca representam grupos de microrganismos que estão divididos em várias espécies: grupo *mitis* (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*), grupo *salivarius* (*Streptococcus salivarius* e *Streptococcus vestibularis*), grupo *anginosos* (*Streptococcus anginosos*, *Streptococcus constellatus* e *Streptococcus intermedius*) e grupo *mutans* (*Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae*)(OHO et al., 2000; OTA et al., 2006). Cada espécie mostra-se mais prevalente em determinados sítios da boca que em outros. Por exemplo, o *S. salivarius* predomina na língua e também na saliva, enquanto o *S. mitis* é mais encontrado nas mucosas; o *S. sanguis* e o *S. mutans*, as espécies mais cariogênicas, estão relacionados aos dentes (LOESCHE, 1993).



O *S. mutans* é uma bactéria Gram-positiva que apresenta elevada capacidade de fermentação, acumulando, portanto, grande quantidade de ácidos e promovendo redução de pH. É um microrganismo facultativo capaz de produzir polissacarídeos extracelulares e intracelulares que favorecem a aderência microbiana (LOESCHE, 1993).

O *S. mutans* é considerado o agente etiológico primário da cárie dental humana e apresenta grande capacidade de colonizar a superfície dentária através da formação de biofilme. Motegi et al. (2006) estudaram através de diferentes técnicas os genes do *S. mutans* associados à formação de biofilme. Pode ser verificado que vários genes desta bactéria estão ligados a formação do biofilme, assim como ocorre com outros microrganismos.

A diversidade genotípica deste microrganismo também tem sido objeto de estudo. Napimoga et al. (2004) avaliaram a diversidade genotípica de *S. mutans* isolado de pessoas com cárie e cárie free, por meio de técnicas moleculares. Os resultados identificaram mais de 24 genótipos de *S. mutans* em indivíduos cárie free e, naqueles com cáries, os genótipos foram superiores a 44. Este vasto número de genótipos evidencia que a virulência desta bactéria depende do tipo de genótipo.

É importante considerar que outros microrganismos já foram encontrados na microbiota subgengival de pacientes com periodontite, como o *E. faecalis* e a *P. aeruginosa* (COLOMBO et al., 2002).

O *E. faecalis* constitui outra bactéria de importância na boca, muito relacionada com as infecções endodônticas e que tem sido objeto vários estudos, particularmente aos relacionados com os fracassos do tratamento endodôntico (MOLANDER et al., 1998; SIRÉN et al., 1997; SUNDQVIST et al., 1998; HANCOCK et al., 2001).

É uma bactéria Gram-positiva, facultativa, que apresenta como fatores de virulência a produção da substância de agregação e de agentes de adesão superficial que favorecem a aderência às células do hospedeiro e matrizes extracelulares, facilitando a invasão tecidual (PORTENIER et al., 2003). Além destes aspectos que destacaram esta bactéria como importante nas infecções endodônticas, deve-se ressaltar a capacidade de sobreviver em condições adversas, como em ambiente de elevado pH e elevadas concentrações de cloreto de sódio (SLOTS & TAUBMAN, 1992; BYSTRÖM et al., 1985; MOLANDER et al., 1998; LOVE, 2001; EVANS et al., 2002; CHAVEZ DE PAZ et al., 2007).

A composição da microbiota endodôntica, em casos que respondem bem à terapia endodôntica, e naqueles persistentes, tem sido associada à presença de enterobactérias no interior do canal infectado ou àquelas que foram introduzidas durante o tratamento, em função do inadequado isolamento da área, infiltração marginal ou canal deixado aberto para a drenagem (MOLANDER et al., 1998).

Love (2001) analisou o provável mecanismo que permite explicar de que forma o *E. faecalis* pode sobreviver e multiplicar dentro dos túbulos dentinários e do canal radicular obturado. O fator de virulência do *E. faecalis* no fracasso de dentes tratados endodonticamente pode estar relacionado à habilidade das células microbianas manterem a capacidade para invadir os túbulos dentinários e aderir ao colágeno. O *E. faecalis* apresenta capacidade de tolerar microambiente cujo pH demonstra um valor aproximado de 11,1 (EVANS et al., 2002; CHAVEZ DE PAZ et al., 2007).

Sundqvist & Figdor (2003) realçaram que a infecção do canal radicular não é caracterizada por um evento randomizado. Sirén et al. (1997), investigando a relação entre procedimentos clínicos e a ocorrência de bactérias entéricas

facultativas em infecções radiculares, observaram que o *E. faecalis* representa a bactéria entérica mais comum. Em 33% dos casos, em que o *E. faecalis* foi isolado, apareceu como uma monoinfecção.

Chávez de Paz et al. (2007) investigaram se as bactérias isoladas de canais radiculares infectados melhor sobreviveriam a um pH alcalino quando em biofilme ou em cultura planctônica. Os biofilmes e culturas planctônicas bacterianas foram mantidos a um pH de 10,5 por 4 horas e a viabilidade celular foi microscopicamente determinada usando o método de corante fluorescente. Adicionalmente, o perfil das proteínas produzidas pelas bactérias testadas foi avaliado. O *E. faecalis* resistiu melhor ao pH alcalino em biofilme do que em cultura planctônica, embora as células planctônicas parecessem usar a agregação e o transporte extracelular de proteínas específicas como mecanismo de sobrevivência.

À sua vez, a doença periodontal representa um importante problema de saúde pública mundial, que afeta a maior parte da população adulta, especialmente por volta de 35 a 40 anos. Esta doença tem início com a gengivite e quando não tratada avança para uma periodontite destrutiva. A higiene bucal e a idade explicam a variação da severidade da doença. A periodontite crônica, por sua vez, ocorre em alguns indivíduos que sofreram destruição avançada. Ela afeta dentes específicos e apresenta progressão contínua, com episódios de exacerbação localizada e outros de regressão da doença inflamatória. Clinicamente se observa inflamação gengival, com alterações de cor e textura, sangramento à sondagem na bolsa gengival, redução da resistência dos tecidos periodontais à sondagem, perda de inserção gengival e também do osso alveolar (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a).

Independente do tipo de doença periodontal, deve-se considerar que esta infecção é causada pela presença de alguns microrganismos patogênicos nas

superfícies dentárias supra ou subgingival. Estima-se que as contagens microbianas em sítios subgingivais variam de  $10^3$  em sulcos rasos saudáveis, até  $10^8$  em bolsas periodontais profundas. Os números na placa supragingival podem exceder  $10^9$  em uma única superfície dentária (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005b). Deve-se reconhecer que as relações ecológicas entre a microbiota periodontal e o seu hospedeiro são benéficas, uma vez que a injúria aos tecidos de suporte é pouco frequente. Porém, ocasionalmente, algumas espécies bacterianas podem se multiplicar ou expressar diferentes fatores de virulência que acarretam alterações periodontais.

As doenças periodontais apresentam determinadas particularidades comuns à outras doenças infecciosas. Contudo, existem características muito distintas. Uma associação entre espécies bacterianas subgingivais foram identificadas como complexos microbianos subgingivais. Os complexos azul (*Actinomyces* sp.), amarelo (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus* sp., *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*), verde (*Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga concisus*, *A. actinomycetemcomitans*), e roxo (*Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*) parecem colonizar a superfície dentária e proliferar em estágios iniciais do desenvolvimento da placa dental. O complexo laranja (*Campylobacter gracillis*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*) torna-se, posteriormente, mais dominante em número; pressupõe-se que espécies desse complexo atuam agregando os colonizadores iniciais. O complexo vermelho (*P. gingivalis*, *B. forsythus*, *T. denticola*)

torna-se mais dominante em número nos estágios tardios do desenvolvimento da placa dental (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a, b).

O avanço da doença periodontal depende da ocorrência simultânea de vários fatores: hospedeiro suscetível, características de virulência da população microbiana e sítio de infecção. A ocorrência simultânea desses fatores não acontece com frequência, o que possibilita à doença periodontal ser mais prevalente e severa em determinadas populações (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1991,1992).

Diferentes métodos de isolamento e identificação microbiana, como métodos de cultura, imunofluorescência, sondas de DNA têm sido empregados (IGARASHI et al., 1996a,b; SOCRANSKI et al., 1998; MOMBELLI et al., 2000; DOUNG-UDOMDACHA et al., 2000; YANO-HIGUSHI et al., 2000; VAN WINKELHOFF et al., 2002; FOUAD et al., 2002; JERVØE-STORM et al., 2005). Entretanto, verifica-se que muitos microrganismos importantes nas doenças infecciosas da cavidade bucal não são cultiváveis ou são de difícil isolamento. Desta forma, a reação em cadeia da polimerase se torna uma forma muito mais rápida, efetiva e sensível para a identificação destes microrganismos. Um número baixo de células microbianas é suficiente para a identificação, o que pode não ser possível através da cultura de microrganismos (SIQUEIRA. & RÔÇAS, 2001, 2002, 2003a, b, 2004; SANTOS et al., 2004; SPOLIDORIO & SPOLIDORIO, 2005). Considera-se que a técnica da PCR seja sensível o suficiente para detectar a presença de microrganismos em quantidade menor que 50 ufc (unidades formadoras de colônia).

Devem ser privilegiados todos os cuidados quanto à técnica de coleta e para transporte, a cultura e o isolamento dos diferentes tipos de microrganismos. É essencial ressaltar que a cultura é uma técnica importante e amplamente empregada na rotina microbiológica. Com relação à endodontia, a cultura pode ser associada às

identificações por meio da PCR, considerando algumas características particulares da microbiota do canal radicular: presença de microrganismos de difícil cultivo e grande número de microrganismos anaeróbios. Como limitação, a PCR detecta moléculas de DNA presentes no canal radicular, o que não significa que estes estejam viáveis. Deve-se considerar a possibilidade de identificação de microrganismos que penetraram no canal radicular, porém, não conseguiram se estabelecer e sobreviver e, até o momento, não se sabe quanto tempo o DNA de microrganismos mortos pode persistir no canal radicular (SUNDQVIST & FIDGOR, 2003).

Haffajee et al. (1997) estudaram a microbiota antes e depois do tratamento periodontal de 57 voluntários com periodontite. As amostras de placa subgingival foram analisadas com o emprego do *checkerboard DNA-DNA hybridization*. Verificou-se que o tratamento periodontal promoveu uma redução dos seguintes microrganismos: *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythensis*.

Meurman et al. (1997) compararam dois métodos para a identificação de microrganismos (cultura e PCR) em amostras de placa subgingival coletadas de 58 indivíduos. Os resultados mostraram que a técnica da PCR e cultura apresentaram, respectivamente, resultados positivos para a *T. forsythensis* em 89,7% e 37,9% dos casos. Concluiu-se que a PCR é uma técnica mais rápida, sensível e específica, além de não depender da presença de células viáveis para a identificação de microrganismos.

Haffajee et al. (1998) estudaram através do *checkerboard DNA-DNA hybridization* a existência de diferenças microbianas na placa subgingival de 203 pacientes de 3 grupos: indivíduos com periodonto saudável, idosos em manutenção periodontal e adultos com periodontite. Observou-se algumas diferenças na

microbiota dos 3 grupos de pacientes, podendo-se concluir que os microrganismos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythensis*) foram mais relevantes em indivíduos com periodontite, sendo encontrados mais freqüentemente em bolsas periodontais profundas, enquanto que algumas espécies comumente encontradas, como *Actinomyces naeslundii*, *S. sanguis* e *S. oralis* não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Mombelli et al. (2000), empregando a técnica de cultura microbiana avaliaram em placas subgingivais de 17 indivíduos com periodontite crônica os padrões de distribuição das seguintes espécies bacterianas: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados mostraram que nos indivíduos que apresentavam sangramento, o número de sítios com a presença de *P. intermedia* e *P. nigrescens* foi elevado. Nos casos em que houve a persistência de bolsas periodontais com profundidade superior a 4 mm, maior frequência de *P. gingivalis* foi observada.

Van Winkelhoff et al. (2002) analisaram por meio de cultura a microbiota de 116 indivíduos com periodontite e em 94 indivíduos com saúde periodontal ou gengivite. Os resultados demonstraram a presença de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *P. micros*, *T. forsythensis*, *C. rectus* e *A. actinomycetemcomitans*. As espécies mais freqüentemente associadas à destruição do periodonto foram *P. gingivalis* e *T. forsythensis*. Porém, todas as espécies, com exceção do *C. rectus* foram isoladas de indivíduos com periodontite.

Colombo et al. (2002) analisaram por meio de *checkerboard DNA-DNA hybridization*, a composição da microbiota subgingival de indivíduos com periodontite e com periodonto saudável. Observou-se uma microbiota complexa com a presença de periodontopatógenos comumente encontrados em outras populações,

como *S. sanguis*, *S. oralis* e *A. naeslundii* em mais de 50% dos sítios analisados. Porém foi relatada a presença de microrganismos incomuns, como *E. faecalis* e a *P. aeruginosa*.

Mager et al. (2003) observaram por meio de *checkerboard DNA-DNA hybridization* a presença de 40 espécies bacterianas em amostras coletadas da saliva e de sítios da cavidade bucal: dorso, superfície lateral e ventre da língua; assoalho bucal; mucosa jugal; palato duro; região anterior do vestíbulo; lábios superior e inferior; gengiva inserida dos dentes ântero-superiores e placas supra e subgengival. As amostras foram coletadas em 225 pacientes saudáveis e com idade superior a 18 anos. Os resultados mostraram diferenças entre os padrões de colonização nas amostras de tecido duro e tecidos moles. A microbiota das placas supra e subgengival diferiram da dos demais sítios analisados pela elevada proporção de *Actinomyces sp.*

Ressalta-se uma preocupação na identificação dos microrganismos responsáveis pelas infecções periodontais (HAFFAJEE et al., 1998; CHAVES et al., 2000; RUDIGER et al., 2002; ELLEN & GALLIMANAS, 2005; LEDDER et al., 2007) e, também, suas identificações em outros sítios da boca (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002; COLOMBO et al., 2002; CORTELLI et al., 2005; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a, b).

A *P. gingivalis* é considerada um importante patógeno periodontal. Este microrganismo é um bastonete anaeróbio, imóvel, assacarolítico, Gram-negativo, com morfologia de cocobacilo. A *P. gingivalis* é um membro do grupo bacteroides pigmentados, bactérias que formam colônias de pigmento castanho a preto em ágar-sangue (TANNER et al., 1992; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a). Essa espécie é reduzida em sítios saudáveis e nos casos de gengivite. Porém é muito encontrada em



casos de doença periodontal recorrente ou quando há a persistência de bolsa periodontal profunda após o tratamento (HAFFAJEE et al., 1988, CHAVES et al., 2000; MOMBELLI et al., 2000).

Os principais fatores de virulência da *P. gingivalis* são produção de endotoxina, colagenase, fibrinolisinase, hemolisinas e proteases (fosfolipase A e *gingipain*). Pode-se citar, também, como fatores de virulência a degradação de imunoglobulinas, o fator inibidor de fibroblasto, o fator indutor de reabsorção óssea e a invasão de células epiteliais *in vitro* (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a).

A invasão de células epiteliais é devido à protease denominada *gingipain*, que promove alterações na matriz extracelular e/ou na superfície dos receptores das células do hospedeiro. Além disso, essa protease pode induzir a morte celular através de mecanismos ainda desconhecidos; degradar componentes estruturais do tecido periodontal, incluindo o colágeno, a fibronectina, a elastina e a caderina E, um membro da família das caderinas. As caderinas são moléculas transmembranas que mediam a adesão intercelular, sendo responsáveis pela manutenção da morfologia celular, pela determinação da organização tecidual e, também, pela transdução de sinais. Portanto, a alteração da caderina E, facilita a invasão celular e altera a integridade tecidual, características típicas da doença periodontal (CHEN et al., 2001).

A *P. gingivalis* pode inibir a migração de polimorfonucleares (PMNs) pela barreira epitelial (MADIANOS et al., 1997). Este microrganismo tem sido associado a um risco aumentado de gravidade e progressão da doença periodontal (BECK et al., 1990, 1992; GROSSI et al., 1994, 1995; KIMURA et al., 2000; GEMMEL et al., 2002).

A *P. intermedia* é outro bacteróide pigmentado de preto que tem demonstrado ser particularmente elevado na gengivite ulcerativa necrosante aguda

(LOESCHE et al., 1982), em certas formas de periodontite e em sítios progressivos de periodontites crônicas. Apresenta morfologia de bastonete arredondado, é anaeróbio e Gram-negativo (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005b). Esta espécie apresenta diversas propriedades virulentas exibidas pela *P. gingivalis* e induz infecções mistas quando inoculada em animais de laboratório (HAFSTROM & DAHLÉN, 1997). Também tem mostrado ser capaz de invadir células do epitélio bucal *in vitro* (DORN et al., 1998; TOKUDA et al., 2001, 2003). Anticorpos séricos elevados contra essa espécie têm sido observados em alguns mas não em todos os indivíduos com periodontite refratária (HAFFAJEE et al. 1988). Esta bactéria apresenta como importante fator de virulência a capacidade de adesão a superfícies duras e tecidos moles da cavidade bucal (SLOTS & GIBBONS, 1978; GENCO et al., 1994; PAPAIOANNOU et al., 1999). A persistência da *P. intermedia* após a terapia mecânica padrão tem se mostrado associada a elevada proporção de sítios com sangramento à sondagem (MOMBELLI et al., 2000).

A *P. intermedia*, o *A. actinomycetemcomitans* e a *P. gingivalis* foram identificados em sulcos perimplantares de 19 pacientes parcialmente desdentados pela PCR. Dentre os 19 pacientes, 10 apresentavam histórico de doença periodontal e 9 não apresentavam antecedentes. Os resultados obtidos nesta análise foram relacionados com a profundidade do sulco perimplantar, o sangramento à sondagem e o provável risco de doença. Constatou-se que houve a amplificação do DNA das bactérias-alvo em 7 amostras, sendo 4 de pacientes sem histórico de periodontopatia. Este resultado sugere que mesmo na ausência de sinais inflamatórios significantes, essa detecção qualitativa pode indicar risco de perimplantite, o que requer manutenção pós-operatória mais rigorosa (LEITÃO et al., 2005).

É relevante enfatizar que os microrganismos coexistem em diferentes sítios da boca e que, em algum momento, podem ser estabelecidas inter-relações entre os microrganismos dos diferentes ecossistemas. Por conseguinte, considerando a diversidade da microbiota bucal, torna-se fundamental investigar a prevalência de microrganismos dentro de populações específicas (ALI et al., 1997; YANO-HIGUCHI et al., 2000; DAROUT et al., 2002; TANAKA et al., 2002; GAJARDO et al., 2005).

Diferentes estudos têm avaliado as células microbianas da boca e o avanço nas técnicas microbiológicas, o que permitiu valorizar a técnica de PCR como alternativa importante no diagnóstico, tratamento e prevenção de várias patologias, como a cárie dental, doença periodontal e infecções endodônticas (MÖLLER, 1966; SUNDQVIST, 1976, 1992; KERÉKES & OLSEN, 1990; SLOTS et al., 1995; UMEDA et al., 1998; BOGEN et al., 1999; MOLLANDER et al., 2002; SIQUEIRA et al., 2001, 2003a; SANTOS et al., 2004; GOMES et al., 2005; TANNER et al., 2006).

Outrossim, de acordo com a retrospectiva da literatura uma das técnicas mais específicas para a detecção de microrganismos da doença periodontal é a PCR (SPRATT, 2003).



### **3. PROPOSIÇÃO**

O presente estudo apresenta como objetivos:

1. Identificar *S. mutans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em pacientes com periodontite crônica, empregando a técnica da reação em cadeia da polimerase.

2. Determinar a prevalência destes microrganismos na saliva e em diferentes sítios da boca (dorso da língua, mucosa jugal, placa bacteriana supragengival, placa bacteriana subgengival).



## **4. MATERIAL E MÉTODO**

## **Perfil dos Pacientes**

O estudo incluiu 30 indivíduos voluntários com indicações para tratamento periodontal, encaminhados ao curso de especialização em periodontia da Associação Brasileira de Odontologia-seção Goiás. O trabalho foi desenvolvido posterior à aprovação junto ao comitê de ética (Protocolo número 65 / 2006 - ICB-UFG), esclarecimento dos pacientes quanto à pesquisa a ser desenvolvida, consentimento dos mesmos e realização da anamnese de cada paciente, investigando com detalhes as histórias médica e odontológica. Os gêneros dos voluntários constituíram-se de 22 indivíduos femininos e 8 masculinos, com idade entre 20 a 63 anos (idade média de 37 anos). Os critérios de inclusão foram: indivíduos saudáveis (sem o relato de doenças sistêmicas), com ausência de dor odontogênica, diagnóstico de periodontite crônica e indicação para tratamento periodontal. Em todos os dentes selecionados para a coleta de amostras de placa supra e subgingival havia a vitalidade pulpar, aferida com a aplicação de gás refrigerante (diclorodifluormetano, -20°C, Aeroget, Ind. Bras., SP Brasil). Outro aspecto considerado foi a ausência de cárie dental associada aos dentes empregados no estudo. Os fatores de exclusão do estudo envolveram pacientes gestantes, pacientes com problemas sistêmicos, pacientes que usavam medicações e aqueles que receberam tratamento antimicrobiano ou terapia periodontal nos últimos três meses.

### **Coleta das Amostras**

Foram coletadas amostras de saliva e de amostras de raspados de superfícies dos seguintes sítios da boca - 1. mucosa jugal; 2. dorso da língua; 3. placa supragengival; 4. placa subgengival

Para as placas supragengival e subgengival, a coleta foi realizada em 2 sítios diferentes. Em 55% das bolsas periodontais a profundidade foi superior a 4mm e em 45% maior que 6mm. A seqüência de coletas obedeceu a seguinte ordem: saliva, mucosa jugal, dorso da língua, placa supragengival e placa subgengival. Todos os cuidados com a assepsia foram observados durante o estudo

Para a coleta da saliva, duas pontas de papel esterilizadas e de número 50 (Tanari, Tanariman Indústria, Ltda., Manacaru, AM, Brasil) foram imersas em saliva não estimulada durante 1 minuto. Para os demais sítios, as coletas foram realizadas por meio de fricção das superfícies epiteliais e dentárias durante 1 minuto, por meio de duas pontas de papel absorvente de número 50, esterilizadas. A seguir, transferiu-se as pontas de papel para tubos do tipo Eppendorf, com capacidade de 1,5 mL, contendo 500µL de solução tampão (PBS – tampão fosfato de Sorensen) esterilizada. As amostras foram conservadas em freezer a -20°C para posterior análise. Na seqüência, os pacientes foram submetidos ao tratamento periodontal necessário.

### **Análise Microbiológica**

A identificação microbiana das bactérias foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase – PCR – multiplex. A técnica fundamenta-se em



reações enzimáticas cíclicas de desnaturação pelo calor, hibridização dos oligonucleotídeos e síntese enzimática de DNA, resultando na amplificação exponencial da seqüência de DNA desejada, a qual permite a identificação de seqüências de genes específicos, tais como genes de espécies bacterianas. Todos os pares de oligonucleotídeos – *primers* – específicos foram sintetizados pela Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os oligonucleotídeos liofilizados foram preparados num volume calculado para obter a concentração de 50 $\mu$ M/ $\mu$ L.

### **Extração do DNA e Reação de PCR**

Para a extração do DNA, os tubos do tipo Eppendorf com as amostras foram descongelados sob refrigeração, submetidos ao agitador de tubos por 1 minuto e centrifugados durante 5 minutos a 5.000 rpm, seguido de redução do volume de 500 $\mu$ L para 300 $\mu$ L, permitindo o aumento da concentração de células microbianas. Na seqüência, os tubos do tipo Eppendorf foram submetidos à fervura a 100° C por 10 minutos seguido de congelamento a -20°C, etapa que finalizou o preparo da amostra.

O processo de extração do DNA foi certificado. Para tanto, a 10 $\mu$ L de cada amostra foram acrescidos 3 $\mu$ L de azul de bromofenol. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% e a corrida eletroforética realizada em tampão TBE 1X (tampão Tris-Borato-EDTA), a 72 volts por 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio (1 $\mu$ g/ mL) durante 30 minutos, seguido de imediata visualização em um transiluminador de luz ultravioleta.

Para a reação de PCR multiplex foram utilizados tubos do tipo Eppendorf com capacidade de 1,5 mL. Uma mistura de reagentes específicos (*Mix*) foi

preparada com água ultra-pura, solução tampão (10X PCR *Buffer* - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), solução de cloreto de magnésio 50mM (MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), dNTP Mix 10mM (contendo água miliQ e os quatro oligonucleotídeos: A, T, C e G – Invitrogen, Carlsbad, CA,USA), os dois *primers* das bactérias investigadas (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) e a Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Para a análise de *E. faecalis* e *S. mutans* preparou-se um Mix, para cada amostra analisada, composto por: 2,5µL de 10X PCR *Buffer*, 1,75µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5µL de dNTP Mix a 10mM, 1,0µL de cada *primer* (*E. faecalis* F – GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG, *E. faecalis* R – CCG TCA GGG GAC GTT CAG, *S. mutans* F – ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G, *S. mutans* R – CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C) específico para os microrganismos estudados, 0,2µL de Taq DNA Polimerase e 13,05µL de água ultra-pura, de forma que o volume total de cada reação fosse igual a 25 µL.

Alíquotas de 20µL do Mix foram distribuídas em tubos do tipo Eppendorf com capacidade para 100µL (MicroAmp™ Reaction 100µL) adequadamente identificados e, após a homogeneização das amostras, 5µL de cada amostra foram adicionados. Os tubos foram acondicionados no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany), seguindo o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, e 36 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, sendo a reação finalizada a 72°C por 10 minutos.

Para o estudo da presença de *P. gingivalis* e *P. intermedia*, preparou-se um Mix, para cada amostra analisada, composto por: 2,5µL de 10X PCR *Buffer*, 1,75µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5µL de dNTP Mix 10mM, 1,0µL de cada *primer* (*P.*

*gingivalis* F - AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG, *P. gingivalis* R - ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT, *P. intermedia* F – CGT GGA CCA AAG ATT CAT CGG TGG A, *P. intermedia* R – CCG CTT TAC TCC CCA ACA AA) específico para os microrganismos estudados, 0,2 $\mu$ L de Taq DNA Polimerase e 13,05 $\mu$ L de água ultra-pura, de forma que o volume total de cada reação fosse igual a 25 $\mu$ L.

Alíquotas de 20 $\mu$ L do Mix foram distribuídas em tubos do tipo Eppendorf com capacidade para 100 $\mu$ L (MicroAmp<sup>TM</sup> Reaction 100 $\mu$ L) adequadamente identificados e, em seguida, após a homogeneização das amostras foi adicionado o volume de 5  $\mu$ L de cada amostra analisada. Os tubos foram acondicionados no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany), seguindo o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguindo-se de 36 de desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento dos oligonucleotídeos a 56°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos; sendo a reação finalizada a 72°C por 10 minutos.

### **Eletroforese**

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose ultra pura a 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em tampão TEB 1x (tampão Tris-Borato-EDTA – pH 8,5). Para tanto, a 10 $\mu$ L do produto da PCR foram acrescidos 3 $\mu$ L de azul de bromofenol. A eletroforese foi realizada em solução tampão TBE 1X (tampão Tris-Borato-EDTA) em corrente contínua de 72 volts por 60 minutos. Um marcador Lambda Hind 100pb (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi empregado como marcador de peso molecular, e também, se empregou controles positivo e negativo da reação. Os controles positivos foram realizados com a aplicação de 10 $\mu$ L de DNA de cada cepa

padrão, *American Type Culture Collection* (*Streptococcus mutans* – ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* - ATCC 29212, *Porphyromonas gingivalis* - ATCC 33277 e *Prevotella intermedia* – ATCC 25611) previamente extraído, empregando o protocolo anteriormente citado. Os controles negativos foram realizados com a aplicação de 10 $\mu$ L de água ultra-pura acrescidos de 3 $\mu$ L de azul de bromofenol. Finalizada a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio (1 $\mu$ g/ mL) durante trinta minutos e observados em um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica foi obtida por uma máquina Nikon Coolpix 995 (Nikon Corporation, Tokio, Japão).

### **Análise dos Dados**

A prevalência das bactérias estudadas na saliva e para todos os sítios investigados foi analisada pelo teste de Qui-quadrado (SPSS; Inc., v.15 for Windows, Chicago,IL, EUA).



## **5. RESULTADOS**

Os resultados mostraram a prevalência do *S. mutans* em 70% das amostras de saliva, 60% das amostras de raspados de dorso da língua, 50% das amostras coletadas na mucosa jugal, 56,66% na placa supragengival e 53,33% na placa subgengival ( $p=0,575$ ).

A prevalência de *E. faecalis* foi de 3,33% nas amostras de saliva, 13,33% nas amostras de raspados de dorso da língua, 3,33% nas amostras coletadas na mucosa jugal, 6,66% na placa supragengival e 6,66% na placa subgengival ( $p=0,523$ ).

A *P. gingivalis* apresentou prevalência de 23,33% nas amostras de saliva e dorso da língua, 30% nas amostras coletadas na mucosa jugal, 40% na placa supragengival e 53,33% na placa subgengival ( $p=0,068$ ).

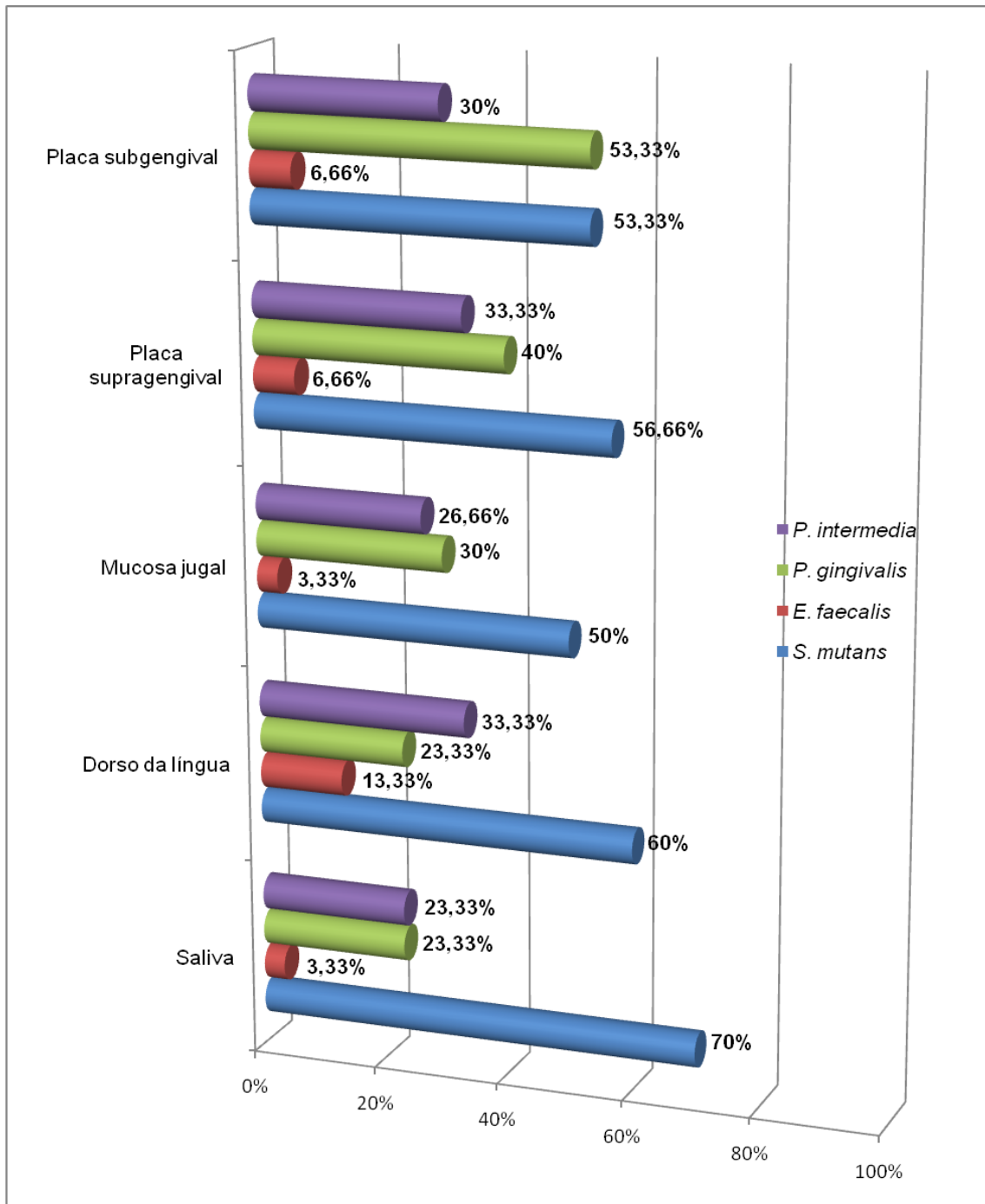
Para a *P. intermedia* verificou-se prevalência em 23,33% nas amostras de saliva, 33,33% nas amostras coletadas na superfície dorsal da língua, 26,66% na mucosa jugal, 33,33% na placa supragengival e 30% na placa subgengival ( $p=0,895$ ).

A Tabela 1 exhibe os resultados da análise estatística pelo teste de Qui-quadrado, evidenciando ausência de diferenças significantes entre a saliva e os sítios analisados ( $p>0,05$ ), para cada bactéria estudada. As Tabelas 2A-C a 5A-C (Anexos) apresentam os resultados individuais obtidos neste estudo. O Gráfico 1 demonstra a prevalência dos microrganismos estudados na saliva, no dorso da língua, na mucosa jugal, na placa supra e subgengival.

**Tabela 1** - Prevalência de *S. mutans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* na saliva e em diferentes sítios da boca.

<b>Bactérias</b>	<b>Local da coleta</b>	<b>n</b>	<b>Presença</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>p</b>
<b><i>S. mutans</i></b>	Saliva	30	21	2,901	0,575
	Dorso da Língua	30	18		
	Mucosa Jugal	30	15		
	Placa Supragengival	30	17		
	Placa Subgengival	30	16		
<b><i>E. faecalis</i></b>	Saliva	30	1	3,214	0,523
	Dorso da Língua	30	4		
	Mucosa Jugal	30	1		
	Placa Supragengival	30	2		
	Placa Subgengival	30	2		
<b><i>P. gingivalis</i></b>	Saliva	30	7	8,734	0,068
	Dorso da Língua	30	7		
	Mucosa Jugal	30	9		
	Placa Supragengival	30	12		
	Placa Subgengival	30	16		
<b><i>P. intermedia</i></b>	Saliva	30	7	1,093	0,895
	Dorso da Língua	30	10		
	Mucosa Jugal	30	8		
	Placa Supragengival	30	10		
	Placa Subgengival	30	9		

(teste de Qui-quadrado) (SPSS Inc., v.15 for Windows, Chicago, IL, EUA)



**Gráfico 1** – Prevalência (%) de *S. mutans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* na saliva, no dorso da língua, na mucosa jugal, na placa supra e subgengival.





## **6. DISCUSSÃO**

A boca contém uma população microbiana que apresenta particularidades relevantes, como variações de morfologias, arranjos celulares, metabolismos, atividades respiratórias e virulências.

O conhecimento dos microrganismos envolve características para cultivo (nutrientes exigidos para o crescimento e as condições físicas que favorecem o desenvolvimento); morfológicas (dimensões das células, seus arranjos, as diferenciações e a identificação de suas estruturas); metabólicas (mecanismos utilizados pelos microrganismos para desenvolver os processos químicos vitais); composição química (identificação dos principais e típicos constituintes químicos das células); antigênicas (componentes químicos especiais das células que fornecem evidências de semelhança entre as espécies) e genéticas (análise da composição dos ácidos nucléicos com a determinação das relações entre o DNA isolado de diferentes microrganismos) (NISENGARD & NEWMAN, 1994).

Todavia, a busca de informações relativas à determinação de microrganismos de importância às doenças da boca e a análise de sua prevalência em sítios variados torna-se essencial. A partir desta fase, a opção seguinte direciona à busca de alternativas terapêuticas para o efetivo controle microbiano.

O curso desta discussão envolve três segmentos – a justificativa para a seleção da técnica de identificação microbiana e suas implicações, a importância dos indicadores biológicos estudados e a interpretação dos resultados observados.

O presente estudo buscou identificar importantes espécies microbianas (*S. mutans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*) na saliva, no dorso da língua, na mucosa jugal, na placa supra e subgingival em pacientes portadores de periodontite crônica, valendo-se da PCR multiplex. A opção por esta técnica ocorreu em função de ser sensível, rápida, permitir alcançar os diferentes tipos respiratórios

de bactérias, facultativas e anaeróbias, além de recuperar células microbianas quando em pequena quantidade, especialmente quando se estuda ecossistemas microbianos ricos.

Os parâmetros seguidos durante o desenvolvimento da metodologia foram atenciosamente valorizados. Quando se envolve estudos microbiológicos torna-se essencial ressaltar a necessidade de cuidados quanto à adoção de uma técnica de coleta e para transporte, cultura e isolamento das diferentes espécies microbianas. A cultura é uma técnica importante e amplamente empregada na rotina microbiológica, entretanto, muitas espécies microbianas presentes nas doenças infecciosas da boca podem não ser cultiváveis ou são de difícil isolamento. A técnica da PCR é extremamente sensível, pode detectar uma única cópia de uma seqüência de DNA em uma amostra que, pela amplificação em uma quantidade tal, torna-se detectável, por exemplo, por coloração após a separação pela eletroforese em gel (SPOLIDORIO & SPOLIDORIO, 2005). A PCR é um método rápido para a identificação microbiana, não necessita da presença viável dos microrganismos, requer baixo número de células microbianas, o que pode não ser possível através da cultura de microrganismos (FRENCH et al., 1986; SIQUEIRA. & RÔÇAS, 2003a, b, 2004; SANTOS et al., 2004; SPOLIDORIO & SPOLIDORIO, 2005). Os métodos moleculares permitem uma identificação mais precisa de células microbianas e com comportamento fenotipicamente divergente (SIQUEIRA et al., 2002; RÔÇAS et al., 2001, 2002).

Vários estudos empregaram esta técnica molecular para identificação microbiana, com distintas justificativas para esta opção metodológica (OHO et al., 2000; COLOMBO et al., 2002; LUO et al., 2002; MOLANDER et al., 2002; SIQUEIRA

et al., 2002; KUMAR et al., 2003; SIQUEIRA. & RÔÇAS, 2003a, b; 2004; SPRATT, 2004; LI et al., 2006; DAVEY & COSTERTON, 2006; LEDDER et al., 2007).

Oho et al. (2000) identificaram *S. mutans* e *S. sobrinus* em saliva humana por meio da PCR. Verificou-se que a técnica da PCR além ser sensível e rápida, comparando a métodos clássicos de cultivo é suficiente para determinar o risco de cárie em indivíduos e é bem indicada para os estudos epidemiológicos. Luo et al. (2002) empregaram a técnica da PCR multiplex para a identificação de fungos patogênicos. A seleção do método foi devido à sua maior rapidez, especificidade e sensibilidade. Considerando o objetivo de identificação de mais de 6 microrganismos, optou-se pela PCR multiplex, que combina vários *primers* espécie-específicos num único tubo. Pode-se concluir que a PCR multiplex mostrou-se como alternativa mais rápida, simples e confiável para a identificação quando comparado aos métodos convencionais. Siqueira et al. (2002) compararam dois métodos para a identificação microbiana (PCR e *checkerboard DNA-DNA hybridization*) do *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P. micros*, *P. endodontalis*. Os resultados foram relativamente compatíveis, considerando-se as duas técnicas empregadas no estudo. Entretanto, a PCR permitiu a identificação de maior número de amostras positivas, o que pode refletir a maior capacidade de identificação da PCR (*P. gingivalis*, 41% de identificação para a PCR e 28% para o *checkerboard DNA-DNA hybridization*). Gomes et al. (2005) investigaram a presença de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* em lesões endodônticas detectadas por cultura e por PCR. Elevada frequência de espécies pigmentadas de preto foi detectada por meio da PCR comparada à cultura.

Contudo, deve-se tomar muito cuidado com afirmações a respeito das patologias ao se empregar as técnicas moleculares, particularmente quando se

afirma que os microrganismos detectados em uma análise molecular são os agentes etiológicos de determinadas doenças. Sabe-se que o material genético de um microrganismo pode permanecer por um período prolongado em um determinado local e posteriormente ser identificado por meio de técnicas moleculares, o que não significa que este seja o agente etiológico (SUNDQVIST & FIGDOR, 2003; BAUMGARTENER, 2004; SPRATT, 2004, NAIR, 2007). Neste sentido, apesar das técnicas moleculares estarem cada vez mais amplamente disponíveis, não se deve menosprezar as técnicas convencionais, especialmente a cultura. O cultivo e isolamento de um microrganismo são essenciais no estudo de doenças infecciosas, uma vez que o crescimento microbiano em cultura pura permite o uso de estudos microscópicos, imunológicos, análise metabólica, testes de suscetibilidade a antibióticos, além de permitir o uso de modelos experimentais. Portanto, ambas as técnicas são de importância nas pesquisas, não cabendo o menosprezo de uma em detrimento a outra (BAUMGARTENER, 2004).

A análise microbiana do presente estudo foi realizada na saliva e em vários sítios da boca (dorso da língua, mucosa jugal, placa bacteriana supragengival, placa bacteriana subgengival), uma vez que há considerações de que os tecidos moles podem servir como reservatórios de microrganismos para a infecção ou reinfecção dos tecidos periodontais (DAHLÉN et al., 1992; QUIRYNEN et al., 2001). A coleta foi realizada de acordo com estudos desenvolvidos anteriormente, utilizando duas pontas de papel absorvente esterilizadas (SIQUEIRA et al., 2002; MOLANDER et al., 2002; SEOUL et al., 2006; SCHIRRMESTER et al., 2007). Para a saliva, as pontas de papel absorvente foram mantidas em saliva não estimulada durante 1 minuto e para os demais sítios foi feita a fricção com as pontas de papel nas superfícies investigadas, no mesmo intervalo de tempo utilizado para a saliva.

A obediência à seqüência de coletas das amostras indicou a necessidade de um maior cuidado com a manutenção da técnica asséptica, com vistas a diminuir as chances de contaminação a partir de outros sítios. Um aspecto que requereu especial atenção, foi a realização de dupla coleta de amostras nas placas supra e subgingival. A justificativa é a possibilidade de variações das microbiotas das placas supra e subgingival, em um mesmo indivíduo (MAGER et al., 2003; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). No presente estudo este aspecto não esteve muito evidente.

Cabe ressaltar os cuidados durante a elaboração dos critérios de exclusão dos indivíduos colaboradores no estudo. Os indivíduos portadores de problemas sistêmicos, usuários de medicações, gestantes e aqueles que receberam tratamento antimicrobiano ou terapia periodontal foram excluídos, pois poderia haver interferência nos resultados da investigação, conforme mencionado em estudos prévios (MARSH, 2000, 2003; KINANE, 2001). Frente aos critérios de inclusão, selecionaram-se dentes que apresentavam vitalidade pulpar, associados a coletas de placas supra e subgingivais. Este fato ocorreu em virtude da possibilidade de haver interferências quantitativas na população de *E. faecalis*, particularmente dependendo do tipo de infecção endodôntica (primária ou secundária)(SUNDQVIST et al., 1998; SUNDQVIST & FIGDOR, 2003). Outro fator relevante relaciona-se ao fato de existirem relatos na literatura a respeito de perda óssea adicional na região de furca quando a infecção de origem endodôntica está presente, o que poderia interferir nos objetivos do corrente estudo (KEREKES & OLSEN, 1990; JANSSON & EHNEVID, 1998).

A determinação da prevalência foi observada a partir da detecção de *S. mutans*, *E. faecalis*, *P.gingivalis* e *P. intermedia* nos sítios descritos anteriormente em indivíduos portadores de periodontite crônica. Estas bactérias são relevantes às

infecções presentes na boca, como a cárie dental, a doença periodontal e a infecção endodôntica (CURTISS, 1985; LOESCHE, 1986; CAUFIELD et al., 1989; BANAS et al., 1990; HAFSTROM & DAHLÉN, 1997; CHAVES et al., 2000; DOUNG-UDOMDACHA et al., 2000; CHEN et al., 2001; LOVE, 2001; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002; EVANS et al., 2002; GEMMELL et al., 2002; HUNG et al., 2002; SUNDQVIST & FIGDOR, 2003; PÖLLÄNEN et al., 2003; HUJOEL et al., 2005; GOMES et al., 2005; KURAMITSU et al., 2005; TANNER et al., 2006; SEOUL et al., 2006; DAVEY & COSTERTON, 2006; SCHIRRMEISTER et al., 2007).

As bactérias selecionadas nesta análise apresentam destaque nos biofilmes das estruturas bucais. Uma característica importante do biofilme é a adesão de bactérias a uma superfície sólida. Na boca, as bactérias podem se aderir a grande variedade de superfícies, incluindo os tecidos moles, a película que recobre os dentes e a outras bactérias. Muitas espécies bacterianas apresentam estruturas de superfície, as fimbrias, que auxiliam em sua adesão a diferentes superfícies. As fimbrias, também denominadas pili, são apêndices compostos por subunidades protéicas denominadas fimbrilinas. Algumas fimbrias também apresentam adesinas e já foram detectadas em grande número de espécies, incluindo *A. naeslundii*, *P. gingivalis* e algumas cepas de estreptococos, como *S. salivarius*, *S. parasanguis* e membros do grupo *mitis* (*S. mitis*). As espécies bucais que apresentam fimbrias incluem *S. salivarius*, *S. mitis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *S. mutans* (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

O *S. mutans* é uma bactéria facultativa relevante na cárie dental humana, com alta concentração quando de seu diagnóstico. É capaz de formar polissacarídeos que favorecem a aderência microbiana, dentre estes a glucosiltransferase A-D (CURTISS, 1985; LOESCHE, 1986, 1993; KOHLER &

KRASSE, 1988; CAUFIELD & WALKER, 1989; BANAS et al., 1990; MAIDEN et al., 1992; KURAMITSU et al., 1995; KURAMITSU & ELLEN, 2000; OHO et al., 2000; OTA et al., 2006; NAPIMOGA et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2006, MATSUMOTO-NAKANO et al., 2007).

O *E. faecalis* (Gram-positiva, facultativa) representa outra bactéria relevante, relacionada às infecções endodônticas, especialmente associadas aos fracassos do tratamento endodôntico (MOLANDER et al., 1998; SIRÉN et al., 1997; SUNDQVIST et al., 1998; SIQUEIRA et al., 2000; HANCOCK et al., 2001; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004). A adesão à superfície do dente é um essencial degrau que determina o potencial de patogenicidade do *E. faecalis*. A influência de proteases e da proteína de ligação ao colágeno desta bactéria foram destaques em alguns estudos. A proteína de ligação ao colágeno, proteína serine, ace e possivelmente a gelatinase são fatores potenciais de virulência que proporcionam ao *E. faecalis* a capacidade de se aderir à estrutura dentinária (MURRAY, 1990; JETT et al., 1994; ARCHIMBAUD, 2002; HUBBLE et al., 2003).

A *P. gingivalis* apresenta-se como patógeno periodontal (bacteroide pigmentado de preto), Gram-negativo (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005), cujos fatores de virulência associam-se à produção de colagenase, proteases, hemolisinas e endotoxinas, podendo inibir a migração de polimorfonucleares (PMNs) através de uma barreira epitelial (MADIANOS et al., 1997; LAMONT & YILMAZ, 2002). As fimbrias presentes na *P. gingivalis* representam os principais componentes para adesão ao tecido dentário e induzem a expressão de citocinas nos fibroblastos gengivais humanos (HANAZAWA et al., 1990).

A *P. intermedia* (bacteroide pigmentado de preto, Gram-negativo), mostra elevada participação na gengivite ulcerativa necrosante aguda (LOESCHE et al., 1982),



e em certas formas de periodontite e em sítios progressivos de periodontites crônicas (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a). Entre as propriedades de virulência observa-se a indução de infecções mistas quando inoculadas em animais de laboratório (HAFSTROM & DAHLÉN, 1997).

Contudo, o periodonto apresenta-se como um microambiente com mudanças constantes no pH, tensão de oxigênio e disponibilidade de nutrientes, em resposta a variações na dieta e na microbiota. Uma variedade de interações físicas e nutricionais entre os microrganismos do biofilme contribui para a natureza dinâmica deste sistema. Mudanças no *habitat* por fatores externos afetam os microrganismos e, por sua vez, a microbiota afeta o *habitat* (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005a).

Convém neste momento discutir os resultados alcançados quanto à prevalência dos indicadores biológicos referidos em distintos sítios da boca. As comparações dos resultados do corrente estudo foram analisadas em determinados microambientes, em função da carência de investigações que utilizaram a mesma técnica, os indicadores biológicos selecionados, os microambientes e os indivíduos com as mesmas características dos incluídos na presente pesquisa.

A prevalência do *S. mutans* nas amostras de saliva foi de 70%, para as amostras de raspados de dorso da língua observou-se 60%, nas amostras coletadas na mucosa jugal verificou-se 50%, na placa supragengival encontrou-se 56,66% e na placa subgengival a prevalência foi de 53,33%. Estes resultados não evidenciaram diferenças significantes ( $p=0,575$ ).

O *S. mutans* constitui uma bactéria muito importante na formação do biofilme em diferentes regiões da boca. Além das características decorrentes de sua patogenicidade (LOESCHE, 1986, 1993; MATSUMOTO-NAKANO et al., 2007), sua capacidade de aderência o destaca como organismo agregador durante a formação

de biofilme. A prevalência de *S. mutans* encontrada no presente estudo também foi elevada em todos os microambientes analisados (frequência acima de 50%). O *S. mutans* é uma das bactérias mais soladas na boca humana (LOESCHE, 1986; OHO et al., 2000; LI et al., 2001). Wu et al. (2003) verificaram que a prevalência de *S. mutans* em placas supragengivais associadas à cárie dental foi de 75,4%. A prevalência desta bactéria na presente investigação mostrou-se uma frequência abaixo desta (56,66%). Todavia, deve-se realçar que os dentes incluídos no estudo não estavam associados à cárie dental.

Outro aspecto a ser mencionado foi à relação quantitativa presente em todos os microambientes observados. Estes aspectos não foram detectados em outros estudos, em função das variações metodológicas empregadas (LOESCHE, 1986, 1993; LÓPEZ et al., 2000; MURRAY, 1990; SLOTS et al., 1991; JETT et al., 1994; WAHLFORST et al. 1995; OHO et al., 2000; YANO-HIGUCHI et al., 2000; MOMBELLI et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2000, 2004; LI et al., 2001; WU et al., 2003; COLOMBO et al., 2002; ARCHIMBAUD, 2002; KUMAR et al., 2003; HUBBLE et al., 2003; SEDGLEY et al., 2004; GAJARDO et al., 2005; CORTELLI et al., 2005; MATSUMOTO-NAKANO et al., 2007, LEDDER et al., 2007).

A prevalência de *E. faecalis* foi baixa - 3,33% - nas amostras de saliva, 13,33% nas amostras de raspados de dorso da língua, 3,33% na mucosa jugal, 6,66% na placa supragengival e 6,66% na placa subgengival. Não houve diferença estatística significativa entre os microambientes verificados ( $p=0,523$ ).

O *E. faecalis* é uma bactéria presente em infecções gastrointestinais humanas e também de elevada prevalência na periodontite apical secundária. Os enterococos são classificados entre o segundo e o terceiro microrganismo mais comum nas infecções hospitalares, e desses isolados, 85-95% são *E. faecalis*. A

virulência dos enterococos envolvem a necessidade de adesão aos tecidos do hospedeiro (MURRAY, 1990; JETT et al., 1994; ARCHIMBAUD, 2002; HUBBLE et al., 2003).

O *E. faecalis*, dentre as bactérias avaliadas, foi a que apresentou a menor prevalência (3,33% a 13,33%), em todos os microambientes analisados. Deve-se considerar que esta bactéria não é comum nos sítios selecionados. Colombo et al. (2002) avaliaram por *checkerboard DNA-DNA hybridization* amostras de placa subgengival de 25 pacientes com periodontite crônica e detectaram bactérias não usuais, como o *E. faecalis*. Slots et al. (1991) observaram a prevalência de 23% de bactérias entéricas em pacientes com periodontites.

Torna-se prudente lembrar que os dentes envolvidos nas coletas sub e supragengivais apresentavam vitalidade pulpar e ausência de cárie dental.

Siqueira et al. (2000) identificaram o *E. faecalis* em 14,3% de 28 amostras de canais radiculares de dentes com infecção primária, por meio de *checkerboard DNA-DNA hybridization*. Siqueira et al. (2004), empregando a técnica da PCR, observaram 77% de *E. faecalis* em 22 dentes com infecções secundárias. Sedgley et al. (2004) encontraram a prevalência de 11% de *E. faecalis* em amostras de água destilada esterilizada envolvida em bochecho durante 1 minuto, em 100 pacientes com história de presença de tratamentos endodônticos; nos casos de ausência de tratamento endodôntico houve uma prevalência de 1%. A técnica utilizada neste estudo foi a cultura.

A *P. gingivalis* apresentou prevalência de 23,33% nas amostras de saliva e dorso da língua, 30% nas amostras coletadas na mucosa jugal, 40% na placa supragengival e 53,33% na placa subgengival. Não houve diferenças estatísticas significantes entre os sítios analisados ( $p=0,068$ ). Wahlforst et al. (1995),

comparando por meio de cultura e PCR, verificaram a prevalência de 56% (PCR) e 42% (cultura) de *P. gingivalis* em amostras de placas subgengivais, de 36 indivíduos com periodontia crônica. Mombelli et al. (2000) estudaram a proporção de microrganismos em 832 pacientes após o tratamento de doença periodontal avançada, valendo-se da técnica de cultura. A proporção foi de 59% de *P. gingivalis* em placas subgengivais. Yano-Higuchi et al. (2000) observaram a prevalência de 64,3% de *P. gingivalis* em placas subgengivais de 21 indivíduos com periodontite de adulto, empregando cultura microbiana. Kumar et al. (2003) encontraram em placas subgengivais de 66 pacientes com periodontites crônicas a prevalência de 88% de *P. gingivalis*, utilizando-se da PCR. Gajardo et al. (2005) observaram uma prevalência de 76,4% de *P. gingivalis* em placa subgengival de pacientes com periodontite crônica, valendo-se de cultura como técnica de identificação. Cortelli et al. (2005) identificaram a prevalência de 76% de *P. gingivalis* em amostras subgengivais em 203 indivíduos com periodontite crônica, com a técnica da PCR. Ledder et al. (2007), analisando por meio de PCR multiplex amostras de placas subgengivais de 47 indivíduos com periodontite crônica, verificaram uma prevalência 29% de *P. gingivalis*.

Os resultados destes estudos descritos comparados ao presente mostraram diferenças em função dos microambientes analisados e das técnicas metodológicas empregadas.

Para a *P. intermedia* verificou-se prevalência em 23,33% nas amostras de saliva, 33,33% nas amostras coletadas na superfície dorsal da língua, 26,66% na mucosa jugal, 33,33% na placa supragengival e 30% na placa subgengival. Os resultados mostraram ausência de diferenças estatísticas significantes ( $p=0,895$ ). López et al. (2000) constataram a ocorrência de 33% de *P. intermedia* em placas

subgengivais em 60 indivíduos com periodontite crônica, valendo-se de sondas de DNA. Mombelli et al. (2000) analisaram a prevalência de *P. intermedia* após o tratamento de doença periodontal avançada, por meio de cultura. A proporção foi de 40,6% em placas subgengivais. Gajardo et al. (2005) observaram uma prevalência de 35,2% de *P. intermedia* em placa subgengival de pacientes com periodontite crônica, valendo-se de cultura como técnica de identificação.

Ximenez-Fyvie et al. (2000b) demonstraram que patógenos periodontais Gram-negativos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*) estão presentes na placa supra e subgengival de indivíduos saudáveis e com periodontite. Contudo, apresentaram maior proporção em indivíduos com periodontite, na placa supragengival, quando comparado à placa subgengival. Estes resultados confirmaram a influência da microbiota da placa supragengival na microbiota subgengival.

Os resultados obtidos na presente investigação encontram-se dentro de um índice de valores aproximados aos obtidos em outros estudos, com particulares características nas variáveis e nos métodos (LOESCHE, 1986, 1993; ALI et al., 1997; LÓPEZ et al., 2000; MURRAY, 1990; SLOTS et al., 1991; JETT et al., 1994; WAHLFORST et al., 1995; OHO et al., 2000; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000a,b; YANO-HIGUCHI et al., 2000; MOMBELLI et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2000, 2004; LI et al., 2001; DAROUT et al., 2002; WU et al., 2003; COLOMBO et al., 2002; ARCHIMBAUD, 2002; KUMAR et al., 2003; HUBBLE et al., 2003; PÖLLÄNEN et al., 2003; SEDGLEY et al., 2004; JERVØE-STORM e al., 2005; GAJARDO et al., 2005; CORTELLI et al., 2005; MATSUMOTO-NAKANO et al., 2007, LEDDER et al. 2007).

Os resultados obtidos com o corrente estudo enfatizaram a importância do *S. mutans*, do *E. faecalis*, da *P. gingivalis* e da *P. intermedia* na estruturação de

biofilme nas estruturas dentais, além de sinalizar os possíveis fatores de patogenicidade em função das prevalências, especialmente frente a hospedeiros suscetíveis. A patogenicidade das doenças periodontais é muito complexa. Convenientemente, dentre os aspectos paralelos entre a infecção e o processo de cura, se desenvolve a interferência positiva e oportuna da resposta imunológica do hospedeiro.

O momento científico contemporâneo tem valorizado estudos epidemiológicos, notadamente desenvolvidos em humanos, com vistas a implicações em tomadas de decisões clínicas. O impacto do presente estudo reforça a complexidade da microbiota da boca em parâmetros qualitativos e quantitativos, valorizando os diferentes microambientes. Seguramente novas pesquisas se fazem necessárias, no intuito de se determinar mais precisamente os fatores de virulência microbiana e meios para a neutralização destes, a ponto de buscar o equilíbrio e a harmonia entre a microbiota e o hospedeiro.



## **7. CONCLUSÃO**

Baseado na metodologia utilizada pode-se concluir que:

01. As bactérias *S. mutans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram identificadas nos pacientes com periodontite crônica, na saliva, dorso da língua, mucosa jugal, placa supra e subgingival.
  
02. O *S. mutans* apresentou maior prevalência em todos os microambientes, seguido pela *P. gingivalis* e *P. intermedia*. O *E. faecalis* foi observado em pequena prevalência. Não houve diferença estatística significativa entre a saliva e os sítios estudados.





## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

\* De acordo com o guia para apresentação de trabalhos acadêmicos na Universidade Federal de Goiás.

1. ALI, R.W.; JOHANNESSEN, A.C.; DAHLÉN, G.; SOCRANSKY, S.S.; SKAUG, N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in Northern Cameroon. **J. Clin. Periodontol.**, v.24, p.830-35, 1997.
2. ARCHIMBAUD, C.; SHANKAR, N.; FORESTIER, C.; BAGHDAYAN, A.; GILMORE, M.S.; CHARBONNÉ, F.; JOLY, B. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. **Res. Microbiol.**, v.153, p.75-80, 2002.
3. BAMMANN, L.L.; ESTRELA, C. Aspectos microbiológicos em endodontia. In: ESTRELA, C. **Ciência Endodôntica**. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2004. p.149-74.
4. BANAS, J.A.; RUSSEL, R.R.B.; FERRETTI, J.J. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v.58, p. 667-73, 1990.
5. BAUMGARTNER, J.C.; SIQUEIRA, J.F.; XIA, T.; RÔÇAS, I.N. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. **J. Endod.**, v.30, p.141-4, 2004.
6. BECK, J.D.; KOCH, G.G.; ROZIER, R.G.; TUDOR, G.E. Prevalence and risk indicators for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. **J. Periodontol.**, v.61, p.521-8, 1990.
7. BECK, J.D.; KOCH, G.G.; ZAMBON, J.J.; GENCO, R.J.; TUDOR, G.E. Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. **J. Periodontol.**, v.63, p.93-9, 1992.

8. BOGEN, G.; SLOTS, J. Black pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v.32, p.204-10, 1999.
9. BYSTRÖM, A.; CLAESSION, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod. Dent. Traumatol.**, v.1, p.170-5, 1985.
10. CAUFIELD, P.W.; WALKER, T.M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.** v.27, p.274-6, 1989.
11. CHAVES, E.S.; JEFFCOAT, M.K.; RYERSON, C.C.; SNYDER, B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, p.897-903, 2000.
12. CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; BERGENHOLTZ, G.; DAHLÉN, G.; SVENSÄTER, G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. **Int. Endod. J.**, v.40, p.344-55, 2007.
13. CHEN, Z.; CASIANO, C.A.; FLETCHER, H.M. Protease-active extracellular protein preparations from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce N-cadherin proteolysis, loss of cell adhesion and apoptosis in human epithelial cell. **J. Periodontol.**, v.72, p.641-50, 2001.
14. COLOMBO, A.P.V.; TELES, R.P.; TORRES, M.C.; SOUTO, R.; ROSALÉM JR, W.; MENDES, M.C.S.; UZEDA, M. Subgingival microbiota of Brazilian

- subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v.73, p.360-9, 2002.
15. CORTELLI, S.C.; FERES, M.; RODRIGUES, A.A.B.; AQUINO, D.R.; SHIBLI, J.A.; CORTELLI, J.R. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v.76, p.204-9, 2005.
  16. CURTISS, R.I.I.I. Genetic analysis of *Streptococcus mutans* virulence. **Curr. Top. Microbiol. Immun.**, v.118, p.253-277, 1985.
  17. DAHLÉN, G.; MANJI, F.; BAELUM, V.; FEJERSKOV, O. Putative periodontopathogens in “diseased” and “non-diseased” persons exhibiting poor oral hygiene. **J. Clin. Periodontol.**, v.19, p.35-42, 1992.
  18. DAROUT, I.A.; ALBANDAR, J.M.; SKAUG, N. Correlations between bacterial levels in autologous subgingival plaque and saliva of adult Sudanese. **Clin. Oral Invest.**, v.6, p.210-6, 2002.
  19. DAVEY, M.E.; COSTERTON, J.W. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. **Periodontology 2000**, v. 42, p.3-26, 2006.
  20. DORN, B.R.; LEUNG, K.L.; PROGULSKE-FOX, A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. **Infection Immun.**, v.66, p.6054-7, 1998.
  21. DOUNG-UDOMDACHA, S.; RAWLINSON, A.; DOUGLAS, C.W.I. A novel close-tube quantitative – PCR method for enumerating *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Periodontol. Res.**, v.35, p.247-58, 2000.

22. ELLEN, R.P.; GALIMANAS, V.B. Spirochetes at the forefront of periodontal infections. **Periodontology** **2000**, v.38, p.13-32, 2005.
23. EVANS, M.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis*. **Int. Endod. J.**, v.35, p. 221-8, 2002.
24. FOUAD, A.F.; BARRY, J.; CAIMANO, M.; CLAWSON, M.; ZHU, Q.; CARVER, R.; HAZLETT, K.; RADOLF, J.D. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.3223-31, 2002.
25. FRENCH, C.K. et al. DNA probe detection of periodontal pathogens. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.1, p.58-62, 1986.
26. GAJARDO, M.; SILVA, N.; GÓMEZ, L.; LEÓN, R.; PARRA, B.; CONTRERAS, A.; GAMANAL, J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. **J. Periodontol.**, v.76, p.289-94, 2005.
27. GEMMELL, E.; CARTER, C.L.; BIRD, P.S.; SEYMOUR, G.J. Genetic dependence of the specific T-cell cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* in mice. **J. Periodontol.**, v.73, p.591-6, 2002.
28. GENCO, R.J.; SOJAR, H.; LEE, J.Y.; SHARMA, A.; BEDI, G.; CHO, M.I.; DYER, D.W. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae: structure function and insertional inactivation mutants. In: GENCO, R. et al. **Periodontal Pathogenesis of periodontal disease**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 1994; p.13-23.

29. GOMES, B.P.F.A.; JACINTO, R.C.; PINHEIRO, E.T.; SOUSA, E.L.R.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.R.; SOUZA,-FILHO, R.J. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and PCR. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.20, p.211-5, 2005.
30. GROSSI, S.G.; GENCO, R.J.; MACHTEI, E.E.; HO, A.W.; KOCH, G.; DUNFORD, R.G.; ZAMBON, J.J.; HAUSMANN, E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for bone loss. **J. Periodontol.**, v.66, p. 23-9, 1995.
31. GROSSI, S.G.; ZAMBON, J.J.; HO, A.W.; KOCH, G.; DUNFORD, R.G.; MACHTEI, E.E.; NORDERYD, O.M.; GENCO, R.J. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. **J. Periodontol.**, v. 65, p.260-7, 1994.
32. HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; DIBART, S.; SMITH, C.; KENT JR, R.L.; SOCRANSKY, S.S. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v.24, p.324-34, 1997.
33. HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; TANNER, A.; POLLACK, R.P.; SMITH, C.; KENT JR, R.L.; SOCRANSKY, S.S. Subgingival microbiota in healthy well-maintained elder and periodontitis subjects. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, p.346-53, 1998.
34. HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm, communities, development and treatment. **Periodontology 2000**, v.42, p.7-12, 2006.

35. HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; DZINK, J.L.; TAUBMAN, M.A.; EBERSOLE, J.L. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v.15; p. 390-8, 1988.
36. HAFSTROM, C.; DAHLÉN, G. Pathogenicity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates in a wound chamber models in rabbits. **Oral Microbiol. Immun.**, v.12, p.148-54, 1997.
37. HANAZAWA, S.; TANAKA, S., KIN, M. et al. Application of monoclonal antibodies to the detection of black-pigmented *Bacteroides spp.* in subgingival plaques by immunoslotblot assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.2248-52, 1990.
38. HANCOCK, H.H.; SIGURDSSON, A.; TROPE, M.; MOISEWITSCH, J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.91, p. 579-86, 2001.
39. HUBBLE, T.S.; HATTON, J.F.; NALLAPAREDDY, S.R.; MURRAY, B.E.; GILLESPIE, M.J. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.18, p.121–6, 2003.
40. HUJOEL, P.P.; CUNHA-CRUZ, J.; LOESCHE, W.J.; ROBERTSON, P.B. Personal oral hygiene and chronic periodontitis: a systematic review. **Periodontology 2000**, v.37, p.29-34, 2005.
41. HUNG, S.L.; LIN, Y.W.; WANG, Y.H.; CHEN, Y.T.; SU, C.Y.; LIN, L.J. Permeability of *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through guided tissue regeneration membranes and

- their effects on attachment of periodontal ligament cells. **J. Periodontol.**, v.73, p.843-51, 2002.
42. IGARASHI, T.; YAMAMOTO, A.; GOTO, N. Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.11, p.294-8, 1996b.
43. IGARASHI, T.; YAMAMOTO, A.; GOTO, N. Rapid identification of mutans streptococcal species. **Microbiol. Immunol.**, v.40, p.867-71, 1996a.
44. JANSSON, I.E.; EHNEVID, H. The influence of endodontic infection on periodontal status in mandibular molars. **J. Periodontol.**, v. 69, p. 1392-96, 1998
45. JERVØE-STORM, P-M.; KOLTZSCHER, 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.**, v.32, p.778-83, 2005.
46. JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of *Enterococci*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.7, p.462-78, 1994.
47. KEREKES, K.; OLSEN, I. Similarities in the microfloras of root canals and deep periodontal pockets. **Endod. Dent. Traumatol.**, v.6, p.1-5, 1990.
48. KIMURA, S.; NAGAI, A.; ONITSUKA, T.; KOGA, T.; FUJIWARA, T.; KAYA, H.; HAMADA, S. Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis* adhered ligatures. **J. Periodontol.**, v.71, p.1167-73, 2000.
49. KINANE, D.F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 25, p.8-20, 2001.



50. KOHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenicity. **J. Dent. Res.**, v.67, p.343, 1988.
51. KOLENBRANDER, P.E.; PALMER JR., R.J.; RICKARD, A.H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N.I.; DIAZ, P.I. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontology 2000**, v.42, p.47-79, 2006.
52. KUMAR, P.S.; GRIFFEN, A.L.; BARTON, J.A.; PASTER, B.J.; MOESCHBERGER, M.L.; LEYS, E.J. New bacterial species associated with chronic periodontitis. **J. Dent. Res.**, v.82, n.5, p.338-44, 2003.
53. KURAMITSU, H.K.; CHEN, W.; IKEGAMI, A. Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. **J. Periodontol.**, v.76, p.2047-51, 2005.
54. KURAMITSU, H.K.; ELLEN, R.P. **Oral bacterial ecology – the molecular bases**. 1. ed. England: Horizon Scientific Press, 2000. 314p.
55. KURAMITSU, H.K.; SMORAWINSKA, M.; YAMASHITA, Y. Biologia molecular da virulência dos *Streptococcus mutans*. In: BOWEN W.; TABAK L.A. **Cariologia para a década de 90**. 1. ed. São Paulo: Santos, 1995. p.301-7.
56. LAMONT, R.J.; YILMAZ, Ö. In or out: the invasiveness of oral bacteria. **Periodontology 2000**, v.30, p. 61-9, 2002.
57. LEDDER, R.G.; GILBERT, P.; HUWS, S.A.; AARONS, L.; ASHLEY, M.P.; HULL, P.S.; McBAIN, A.J. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. **App. Env. Microbiol.**, v.73, p.516-23, 2007.
58. LEITÃO, J.A.O.; LORENZO, J.L.; AVILA-CAMPOS, M.J.; SENDYK, W.R. Análise por reação em cadeia da polimerase (PCR) da presença de

- patógenos preditores de risco em sítios periimplantares. **Braz. Oral Res.**, v.19, p.52-7, 2005.
59. LI, Y.; CAUFIELD, P.W.; EMANUELSSON, I.R.; THORNQVIST, E. Differentiation of *S. mutans* and *S. sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.16, p.16-23, 2001.
60. LI, Y.; SAXENA, D.; BARNES, V.M.; TRIVEDI, H.M.; GE, Y.; XU, T. Polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis in the evaluation of oral microbiota. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.21, p.333–9, 2006.
61. LOESCHE, W.J. **Cárie dental – Uma infecção tratável**. 1. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993. 349p.
62. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v.50, p.353-80, 1986.
63. LOESCHE, W.J.; SYED, S.A.; LAUGHON, B.E.; STOLL, J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. **J. Periodontol.**, v.53, p.223-30, 1982.
64. LÓPEZ, N.J. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomians*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v.71, p.948-54, 2000.
65. LOVE, R.M. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. **Int. Endod. J.**, v.34, p.399-405, 2001.
66. LUO, G.; MITCHELL T.G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.2860-5, 2002.

67. MADIANOS, P.N.; PAPAPANOU, P.N.; SANDROS, J. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. **Infect. Immun.**, v.65, p.3983-90, 1997.
68. MAGER, D.L.; XIMENEZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **J. Clin. Periodontol.**, v.30, p.644-54, 2003.
69. MAIDEN, M.F.S.; LAI, C.H.; TANNER, A. Characteristics of oral Gram-positive bacteria. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary oral and immunology**. 1. ed. St. Louis: Mosby, 1992. p.342-72.
70. MARSH, P.D. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. In: KURAMITSU, H.K.; ELLEN, R.P. **Oral Bacterial Ecology**. Wymondham, Horizon Scientific Press, 2000. p.11-65.
71. MARSH, P.D. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. **Oral Diseases**, v.9, p.16–22, 2003.
72. MATSUMOTO, Y.; SUGIHARA, N.; KOSEK, M.; MAKI, Y. A rapid and quantitative detection system for *Streptococcus mutans* in saliva using monoclonal antibodies. **Caries Res.**, v.40, p.15-9, 2006.
73. MATSUMOTO-NAKANO, M.; INAGAKI S.; FUJITA, K.; OSHIMA, T. Molecular analysis of recombinase A in virulence of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v.41, p.285, 2007.
74. MEURMAN, J.H.; WAHLFORS, J.; KORHONEN, A.; ALAKUIJALA, P.; VÄISÄNEN, P.; TORKKO, H.; JÄNNE, J. Identification of *Bacteroides*

- forisithus* in subgingival dental plaque with the aid of a rapid PCR method. **J. Dent. Res.**, v.76, p.1376-80, 1997.
75. MOLANDER, A.; LUNDQVIST, P.; PAPAPANOU, P.N.; DAHLÉN, G.; REIT, C. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from the root canal. **Int. Endod. J.**, v.35, p.1-6, 2002.
76. MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v.31, p.1-7, 1998.
77. MÖLLER, A.J.R. **Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth.** 1966. Tese (Doutorado) - University of Göteborg, Gotemburgo, 1966.
78. MOMBELLI, A.; SCHMID, B.; RUTAR, A.; LANG, N.P. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia / nigrescens* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v.71, p.14-21, 2000.
79. MOTEGI, M.; TAKAGI, Y.; YONEZAWA, H.; HANADA, N.; TERAJIMA, J. WATANABE, H.; SENPUKU, H. Assessment of genes associated with *Streptococcus mutans* biofilm morphology. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, n.9, p.6277-6287, 2006.
80. MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.3, p.46-65, 1990.
81. NAIR, P.N.R. Abusing technology? Culture-difficult microbes and microbial remnants. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.104, p.569-70, 2007.

82. NAIR, P.N.R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critic. Rev. Oral Biol. Med.**, v.15, n.6, p.348-81, 2004.
83. NAPIMOGA, M.H.; KAMIYA, R.U.; ROSA, R.T.; ROSA, E.A.R.; HÖFLING, J.F.; MATTOS-GRANER, R.O.; GONÇALVES, R.B. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. **J. Med. Microbiol.**, v.53, p.697-703, 2004.
84. NEVILLE, B.W.; DAMM, D.A.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. **Oral Maxillofacial Pathology**. 2 ed. Philadelphia, USA: WB Saunders Company, pp. 616–8, 2002.
85. NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Microbiologia Oral e Imunologia**. 2 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1994. 395p.
86. OHO, T.; YAMASHITA, Y.; SHIMAZAKI, Y.; KUSHIYAMA, M.; KOGA, T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.15, p.258-62, 2000.
87. OTA, F.; OTA, M.; MAHAMUD, Z.H.; MOHAMMAD, A.; YAMATO, M.; KASSU, A.; KATO, Y.; TOMATAKE, H.; BATONI, G.; CAMPA, M. Serological diversity demonstrable by a set of monoclonal antibodies to eight serotypes of the mutans streptococci. **Caries Res.**, v.40, p.6-14, 2006.
88. PAPAIOANNOU, W.; STEENBERGHE, D.V.; CASSIMAN, J.J.; ELDERE, J.V.; QUIRYNEN, N. Comparison of fluorescence microscopy and culture assays to quantify adherence of *Porphyromonas gingivalis* to mono- and multi-layered pocket epithelium cultures. **J. Periodontol**, v.70, p.618-25, 1999.

89. PASTER, B.J.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L.; ERICSON, R.E.; LAU, C.M.; LEVANOS, V.A.; SAHASRABUDHE, A.; DEWHIRST, F.E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J. Bacterol.**, v.183, p.3770-83, 2001.
90. PERSON, GR. Site-based versus subject-based periodontal diagnosis. **Periodontology 2000**, v.39, p.145-63, 2005.
91. PÖLLÄNEN, M.T.; SALONEN, J.I.; UITTO, V-J. Structure and function of the tooth–epithelial interface in health and disease. **Periodontology 2000**, v.31, p.12-31, 2003.
92. PORTENIER, I.; WALTIMO, T.; HAAPASALO, M. *Enterococcus faecalis* – The root canal survivor and “star” in post-treatment disease. **Endodontic Topics.**, v.6, p.135-59, 2003.
93. QUIRYNEN, M.; PAPAIOANNOU, W.; van STEENBERGEN, T.M.J.; DIERICKX, K.; CASSIMAN, J.J.; van STEENBERGHE, D. adhesion of *Porphyromonas gingivalis* strains to cultured epithelial cells from patients with a history of chronic adult periodontitis or from patients less susceptible to periodontitis. **J. Periodontol.**, v.72, p.626-33, 2001.
94. RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F.; ANDRADE, A.F.B.; UZEDA, M. Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms. **Anaerobe**, v.8, p.200-8, 2002.
95. RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F.; SANTOS, K.R.N.; COELHO, A.M.A. “Red complex” (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.91, p.468-71, 2001.

96. RÜDIGER, S.G.; CARLÉN, A.; MEURMAN, J.H.; KARI, K.; OLSSON, J. Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. **J. Clin. Periodontol.**, v.29, p.524-30, 2002.
97. SANTOS, C.F.; SAKAI, V.T.; MACHADO, M.A.A.M.; SCHIPPERS, D.N.; GREENE, A.S. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **J. Appl. Oral Sci.**, v.13, p.1-11, 2004.
98. SCHIRRMESTER, J.F.; LIEBENOW, A.L.; BRAUN, G.; WITTMER, A.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. **J. Endod.**, v.33, p.536-40, 2007.
99. SCHONFELD, S.E. Oral microbial ecology. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. St. Louis, Mosby – Year Book, 1992. p. 267-74.
100. SEDGLEY, C.M.; LENNAN, L.; CLEWELL, D.B. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. **Oral Microbiol Immunol.**, v.19, p.95-101, 2004.
101. SEOUL, J.W.; CHO, B.H.; CHUNG, C.P.; BAE, K.S. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, v.32, p.110-14, 2006.
102. SHEARER, B.G. Biofilm and the dental office. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 127, p. 181-89, 1996.
103. SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I, N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.89, p.744-48, 2000.

104. SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I, N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.97, p.85-94, 2004.
105. SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I.N.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P.; SANTOS, K.R.N. Comparison of 16s rDNA-based PCR and checker board DNA-DNA hybridization for detection of selected endodontic pathogens. **J. Med. Microbiol.**, v.51, p.1090-96, 2002.
106. SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I.N. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. **J. Dent.**, v.31, p. 333-339, 2003b.
107. SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I.N. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, and *T. lecithinolyticum* in primary root canal infections. **Arch. Oral Biol.**, v. 48, p. 495-502, 2003a.
108. SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I.N.; FAVIERI, A., OLIVEIRA, J.C.M.; SANTOS, K.R.N. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. **Int. Endod. J.**, v. 34, p. 280-84, 2001.
109. SIRÉN, E.K.; HAAPASALO, M.P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E.N. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. **Int. Endod. J.**, v. 30, n. 2, p. 91-5, 1997.
110. SLOTS, J.; ASHIMOTO, A.; FLYNN, M.J.; LI, G.; CHEN, C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 20, n. 2, p. S304-S307, 1995.



111. SLOTS, J.; GIBBONS, R.J. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. **Infect. Immun.**, v.19, p.254-64, 1978.
112. SLOTS, J.; RAMS, T.E. Mechanisms of oral colonization. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, St. Louis: Ed. Mosby, 1992. p.283-98.
113. SLOTS, J.; RAMS, T.E. Microbiology of periodontal disease. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, St. Louis: Ed. Mosby, 1992. p.425-43.
114. SLOTS, J.; RAMS, T.E.; FEIK, D.; TAVERAS, H.D; GILLESPIE, G.M. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. **J. Periodontol.**, v.62, p.543-47, 1991.
115. SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**. 1. ed. St Louis: Mosby, 1992. 649p.
116. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, v. 28, p.12-55, 2002.
117. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Microbiologia da doença periodontal. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.105-47.
118. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology 2000**, v.38, p.135-87, 2005b.
119. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J. Periodontol.**, v.63, p.322-31, 1992.

120. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT JR, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v.25, p.134-144, 1998.
121. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. **J. Periodont.**, v.26, p.195-212, 1991.
122. SPOLIDORIO, D.M.P.; SPOLIDORIO, L.C. Técnicas básicas de biologia molecular. In: ESTRELA C. **Metodologia científica**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005. p.327-41.
123. SPRATT, D.A. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. **Endod Topics**, v.9, p. 5-14, 2004.
124. SPRATT, D.A.; PRATTEN, J. Biofilms and the oral cavity. **Environm Scien and Bio / Technol.**, v.2, p.109-20, 2003.
125. SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.7, p. 257-62, 1992.
126. SUNDQVIST, G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. 1976. Dissertação (Mestrado) - University of Umea, Umea, Sweden; 1976. 94f.
127. SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and the root-filled root canals. **Endod. Topics**, v.6, p.3-28, 2003.
128. SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SJÖGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.85, p.86-93, 1998.

129. TANAKA, S.; MURAKAMI, Y.; OGIWARA, T.; SHOJI, M.; SETO, K.; NAGASAKI, M.; FUJISAWA, S. Frequency of reactivity for *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella sp.* in supra and subgingival plaques and periodontal clinical parameters according to subject age. **J. Periodontol.**, v.73, p.877-85, 2002.
130. TANNER, A.; LAI, C.H.; MAIDEN, M.F.J. Characteristics of oral Gram-negative species. . In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**. 1. ed. St. Louis: Mosby, 1992. p. 299-341.
131. TANNER, A.C.R.; PASTER, B.J.; LU, S.C.; KANASI, E.; KENT JR, R.; Van DYKE, T.; SONIS, S.T. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. **J. Dent. Res.**, v.4, p.318-23, 2006.
132. TOKUDA, M.; NAGAOKA, S.; TORII, M. Interleukin-10 receptor expression in human dental pulp cells in response to lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*. **J. Endod.**, v.29, p.48-50, 2003.
133. TOKUDA, M.; SAKUTA, T.; FUSHUKU, A.; TORII, M.; NAGAOKA, S. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. **J. Endod.**, v.27, p.273-76, 2001.
134. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. O Mundo Microbiano e Você. **Microbiologia**. In: TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. 8 ed. Porto Alegre, Artmed, 2005. p.1-25.
135. 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.**, v.69, p.828-33, 1998.

136. Van WINKELHOFF, A.J.; LOOS, B.G.; Van Der REIJDEN, W.A.; Van Der VELDEN, U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. **J. Clin. Periodontol.**, v.29, p.1023-8, 2002.
137. WAHLFORST, J.; MEURMAN, J.H.; VÄISÄNEN, P.; ALAKUIJALA, P.; KORHONEN, A.; TORKKO, H.; JÄNNE, J. Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by a rapid PCR method. **J. Dent Res.**, v.74, p.1796-1801, 1995.
138. WU, H.; FAN, M.; ZHOU, X.; MO, A.; BIAN, Z.; ZHANG, Q.; CHEN, Z. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* on the permanent first molars of the Mosuo people in China. **Caries Res.**, v.37, p.374-80, 2003.
139. XIMÉNEZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, p.648-57, 2000a.
140. XIMÉNEZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v.27, p.722-32, 2000b.
141. YANO-HIGUCHI, K.; TAMAKATSU, N.; HE, T.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I.; Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.** v.27, p.597-602, 2000.



**ANEXOS**

Tabela 2A – Distribuição de *Streptococcus mutans* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nichos 1 e 2	Placa Subgengival Nichos 1 e 2			
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	-	+	+	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + + Presença de microrganismos

Tabela 2B – Distribuição de *Streptococcus mutans* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nichos 1	Placa Supragengival Nichos 2	Placa Subgengival Nichos 1	Placa Subgengival Nichos 2	
11	+	+	+	+	+	+	+	
12	-	-	-	-	-	-	-	
13	+	+	+	+	+	+	+	
14	+	+	+	+	+	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	
16	+	+	-	+	+	+	+	
17	+	+	-	-	-	-	-	
18	+	+	+	+	+	+	+	
19	+	+	+	+	+	+	+	
20	+	+	-	-	-	-	-	

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + + Presença de microrganismos

Tabela 2C – Distribuição de *Streptococcus mutans* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nichos 1	Placa Supragengival Nichos 2	Placa Subgengival Nichos 1	Placa Subgengival Nichos 2	
21	-	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	-	-	
23	+	-	+	+	-	+	-	
24	+	+	-	-	+	-	+	
25	-	-	-	-	-	-	-	
26	-	-	-	-	-	-	-	
27	+	-	+	-	+	-	+	
28	-	-	-	-	-	-	-	
29	-	-	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + - Presença de microrganismos



Tabela 3A – Distribuição de *Enterococcus faecalis* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nichos 1 e 2	Placa Subgengival Nichos 1 e 2	Placa Supragengival Nichos 1 e 2	Placa Subgengival Nichos 1 e 2	Placa Subgengival Nichos 1 e 2
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-	-	-
9	-	+	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + - Presença de microrganismos

Tabela 3B – Distribuição de *Enterococcus faecalis* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nicho 1	Placa Supragengival Nicho 2	Placa Subgengival Nicho 1	Placa Subgengival Nicho 2	
11	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	-	-	-	
13	-	-	+	+	+	+	+	
14	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	+	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	+	-	+	
19	-	+	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + - Presença de microrganismos

Tabela 3C – Distribuição de *Enterococcus faecalis* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras					
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nicho 1	Placa Supragengival Nicho 2	Placa Subgengival Nicho 1 Nicho 2
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	+	+
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-

Legenda:

- – Ausência de microrganismos
- + – Presença de microrganismos

Tabela 4A – Distribuição de *Porphyromonas gingivalis* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nicho 1	Placa Supragengival Nicho 2	Placa Subgengival Nicho 1	Placa Subgengival Nicho 2	
1	-	-	-	-	-	+	+	
2	-	-	-	-	-	+	+	
3	-	-	+	+	+	-	+	
4	-	-	-	-	+	+	+	
5	+	+	+	+	+	-	+	
6	-	-	-	-	+	-	+	
7	+	+	+	+	+	-	+	
8	-	-	+	-	+	-	+	
9	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + - Presença de microrganismos

Tabela 4B – Distribuição de *Porphyromonas gingivalis* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nicho 1	Placa Supragengival Nicho 2	Placa Subgengival Nicho 1	Placa Subgengival Nicho 2	
11	-	-	-	+	+	+	+	
12	-	-	-	-	+	+	+	
13	-	-	-	-	+	+	+	
14	-	-	-	-	-	+	-	
15	+	-	+	+	-	+	+	
16	-	-	+	+	+	-	-	
17	+	+	-	+	+	+	+	
18	-	+	-	+	+	+	-	
19	+	-	-	-	-	+	-	
20	-	-	-	+	+	+	+	

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + + Presença de microrganismos

Tabela 4C – Distribuição de *Porphyromonas gingivalis* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nichos 1 e 2	Placa Subgengival Nichos 1 e 2	Placa Supragengival Nichos 1 e 2	Placa Subgengival Nichos 1 e 2	Placa Subgengival Nichos 1 e 2
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	+	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	+	+	-	-	-	+	+
27	-	-	-	+	+	+	-	-
28	-	+	+	+	+	+	-	-
29	+	-	-	+	+	+	+	+
30	+	+	+	-	-	-	+	+

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + + Presença de microrganismos

Tabela 5A – Distribuição de *Prevotella intermedia* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nichos 1 e 2	Placa Subgengival Nichos 1 e 2			
1	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	-	+	-	-	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	+	+	+	+	+	+
7	+	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + - Presença de microrganismos

Tabela 5B – Distribuição de *Prevotella intermedia* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nicho 1	Placa Supragengival Nicho 2	Placa Subgengival Nicho 1	Placa Subgengival Nicho 2	
11	+	+	+	+	-	+	+	
12	-	-	-	-	+	-	+	
13	-	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	+	-	-	-	
15	-	+	-	+	+	-	+	
16	-	+	+	+	-	-	-	
17	+	+	+	-	+	-	+	
18	-	-	-	+	-	+	-	
19	+	+	+	+	+	+	+	
20	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + + Presença de microrganismos



Tabela 5C – Distribuição de *Prevotella intermedia* em vários sítios da boca

Paciente	Amostras							
	Saliva	Dorso da Língua	Mucosa Jugal	Placa Supragengival Nicho 1	Placa Supragengival Nicho 2	Placa Subgengival Nicho 1	Placa Subgengival Nicho 2	
21	-	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	-	-	
24	-	-	-	-	-	-	-	
25	-	-	-	-	-	-	-	
26	-	+	+	+	+	+	+	
27	-	-	-	-	-	-	-	
28	-	+	-	-	-	+	-	
29	-	-	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	-	-	-	+	

Legenda:

- - Ausência de microrganismos
- + + Presença de microrganismos