

PRESENÇA DE PERIODONTO PATÓGENOS EM JOVENS E ADULTOS DA REGIÃO CENTRO-OESTE/NORTE DO BRASIL

Presence of periodontal pathogens in young and adults subjects from Central-West/North regions of Brazil

Paulo César Tavares¹, Juliano Garcia e Fernandes¹, Marcelo Henrique Costa¹, Jonas de Carvalho Filho², Davi Romeiro Aquino¹, José Roberto Cortelli³

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, e *T. forsythia* em 90 indivíduos. Entre estes, encontramos pacientes periodontalmente saudáveis (n=14), com gengivite (n=29) ou periodontite (n=47). Amostras subgengivais foram coletadas e processadas por reação em cadeia da polimerase (PCR). A presença bacteriana foi avaliada por ANOVA, *t* de Student e Wilcoxon. Verificou-se prevalência ($p < 0,05$) de *C. rectus* (92,8%), *P. gingivalis* (7,1%), *T. forsythia* (7,1%), *E. corrodens* (7,0%) e *A. actinomycetemcomitans* (0,0%) para os indivíduos periodontalmente saudáveis. Nos indivíduos com gengivite, *C. rectus* (96,5%), *T. forsythia* (44,8%), *E. corrodens* (28,0%), *A. actinomycetemcomitans* (14,0%) e *P. gingivalis* (10,3%). Para os indivíduos diagnosticados com periodontite, *C. rectus* (97,8%), *T. forsythia* (71,7%), *E. corrodens* (41,0%), *P. gingivalis* (32,6%) e *A. actinomycetemcomitans* (30,0%). Não foi observada diferença estatisticamente significativa para *C. rectus* em função do diagnóstico periodontal, todavia, *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* foram mais prevalentes nos indivíduos diagnosticados com periodontite. Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que *C. rectus* foi a bactéria mais prevalente independente do diagnóstico periodontal, estando a frequência de *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* dependente do diagnóstico de gengivite ou periodontite.

UNITERMOS: Bactérias, epidemiologia, reação em cadeia da polimerase, gengivite, periodontite. R Periodontia 2006; 17:00-00.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma patologia que acomete um grande número de indivíduos em todo o mundo. O fator etiológico principal desta doença é o biofilme dental, que pode promover uma reação inflamatória dos tecidos periodontais em decorrência de processo infeccioso induzido por microrganismos (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY-AAP, 1996).

A exposição do tecido gengival ao biofilme dental resulta na inflamação deste tecido evidenciado clinicamente por alterações de cor, forma e contorno gengival, aumento do exudato, sangramento espontâneo ou provocado (MARIOTTI, 1999). A periodontite, definida como uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, causada por microrganismos específicos, resulta em uma destruição progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar de suporte (NOVAK, 2004).

A doença periodontal é a maior responsável pela perda de dentes em seres humanos, devido a sua natureza crônica e indolor, desenvolvendo-se de forma gradativa e assintomática. Somente nos últimos estágios, com bolsas periodontais profundas e mobilidade dental ela é percebida (MACHION *et al*, 2000).

Dos estudos observacionais, o mais comum é o transversal, ou, também chamado de estudo seccional ou de prevalência. Nos estudos transversais, a presença ou ausência de doença e as características dos mem-

¹ Mestres em periodontia - UNITAU

² Especialista em biologia molecular - UNITAU

³ Professor assistente doutor de periodontia - UNITAU

bros de uma população são verificadas em um determinado momento (ARBES JR & BECK, 2004).

A cavidade bucal humana é habitada por mais de 500 espécies bacterianas (PASTER, 2001). Enquanto a maioria é comensal, uma pequena parte é considerada periodonto patógenos, podendo causar doença periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994). *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *T. forsythia* e *F. nucleatum* são bactérias frequentemente associadas a indivíduos portadores de periodontites (VAN WINKELHOFF *et al*, 2002; DZINK, SOCRANSKY, HAFFAJEE 1988).

Microorganismos específicos têm sido associados a locais de perda de inserção clínica e aumento da idade (LISTGARTEN, LAI, YOUNG 1993). A relação entre a presença de periodonto patógenos e bolsa periodontal é evidente em diversos estudos (SLOTS, 1986; TAKEUCHI *et al*, 2001; SOCRANSKY & HAFFAJEE 1994; SOCRANSKY *et al*, 1988; ZAMBON, 1996; ALPAGOT, 1996; HAFFAJEE & SOCRANSKY 1994; RODENBURG *et al*, 1990; TRAN *et al*, 2001).

Em populações brasileiras, a presença de periodonto patógenos tem sido relacionada a diferentes condições clínicas. Patógenos como *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* apresentam maior prevalência em indivíduos com periodontite, em comparação aos periodontalmente saudáveis (KLEIN & GONÇALVES, 2003). Porém, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, e *T. denticolatus* também são encontrados em casos de saúde periodontal (AVILA-CAMPOS & VELASQUEZ-MELENDZ). Cortelli *et al*. (2005), observaram, em indivíduos diagnosticados com periodontite crônica e agressiva, que a prevalência de *P. gingivalis* foi similar a de outras populações latino-americanas e que *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade esteve associada ao diagnóstico de periodontite agressiva e a bolsas periodontais maiores do que 6 mm de profundidade.

Assim, este estudo se propôs avaliar numa amostra de conveniência da região Centro-Oeste/Norte do Brasil a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *E. corrodens* associada a diferentes condições periodontais em indivíduos jovens e adultos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídos no presente estudo 90 indivíduos (33 homens e 57 mulheres) da região Centro-Oeste (Anápolis, GO) e Norte do Brasil (Gurupi, TO), periodontalmente saudáveis, diagnosticados com gengivite ou periodontite (AAP, 1999). Destes, 14 eram periodontalmente saudáveis, 29 apresentavam gengivite e 47 periodontite.

Após a alocação da amostra e realização dos exames clínicos periodontais, foram coletadas amostras bacterianas do sulco/bolsa gengival das faces méso vestibulares dos dentes 16, 14, 12, 21, 24, 26, 36, 34, 32, 41, 44 e 46 para avaliar a presença dos microrganismos *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans*.

Realizado isolamento relativo com roletes de gaze esterilizada e remoção do biofilme supragengival, foi inserido um cone de papel número 30 (Dentsply®) até a porção mais apical do sulco/bolsa gengival dos dentes selecionados e mantidos em posição por 15 segundos. Após sua remoção, os cones foram colocados em um microtubo do tipo eppendorf® contendo 1,0 ml de solução de Ringer, e armazenados à -70°C para posterior análise laboratorial.

As amostras coletadas tiveram o DNA extraído através da utilização do Kit InstaGene (Biorad), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

O processamento das amostras foi realizado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguindo o protocolo descrito por Haraszthy *et al*, 2000. Sumarizando, a PCR foi conduzida em condições previamente padronizadas, em tubos para PCR contendo uma mistura de reagentes e uma alíquota das amostras. Os tubos foram levados ao aparelho termociclador (*Mastercycler gradient* - Eppendorf®) e submetidos à 35 ciclos de temperatura realizados à 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 50 segundos (extensão) precedidos por um ciclo inicial de 95°C por cinco minutos para desnaturação inicial do DNA.

A seqüência dos *Primers* usados para cada bactéria avaliada no presente estudo encontram-se descritos no **quadro 1**.

Os produtos amplificados nas reações de PCR foram aplicados em géis de agarose, a 1,5%, com brometo de etídio (corante de DNA) e submetidos ao processo de eletroforese durante 120 minutos em uma cuba horizontal (LCH 20x25, Locus Biotecnologia®) ligada à uma fonte para eletroforese (LPS 300V, Locus Biotecnologia®). Em seguida, o géis de agarose foram posicionados sobre um aparelho transluminador de luz ultravioleta (TFX-20M, Life Technologies®), e fotografados (Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak®).

Em todos os géis foi colocado um marcador de peso molecular (Ladder 100 - Invitrogen®) para possibilitar o estabelecimento do peso molecular dos produtos amplificados pela PCR. Foi inserido ainda, um controle positivo cedido pelo Laboratório Fio Cruz (RJ) e um controle negativo para evitar resultados falso positivos ou falso negativos.

Análise estatística: A associação entre a presença dos diferentes patógenos examinados foi realizada por Análise de Variância (ANOVA), *t* de Student e Wilcoxon, todos com

Quadro 1

PRIMERS ESPÉCIE ESPECÍFICOS: SEQUÊNCIAS, POSIÇÕES INTRAGÊNICAS E AMPLICONS ESPERADOS PARA CADA BACTÉRIA		
BACTÉRIA	PARES DE PRIMERS (5''!3')	TAMANHO DO AMPLICON (pb) *
<i>C. rectus</i> (ASHIMOTO <i>et al.</i> , 1996)	TTTCGGAGCGTAACTCCTTTTC	598
	TTTCTGCAAGCAGACACTCTT	
<i>E. corrodens</i> (ASHIMOTO <i>et al.</i> , 1996)	CTAATACCGCATACGTCCTAAG	688
	CTACTAAGCAATCAAGTTGCC	
<i>P. gingivalis</i> (ASHIMOTO <i>et al.</i> , 1996)	AGGCAGCTTGCCATACTGCG	404
	ACTGTTAGCAACTACCGATGT	
<i>T. forsythia</i> (ASHIMOTO <i>et al.</i> , 1996)	GCGTATGTAACTGCCCGCA	641
	TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT	
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (HARASZTHY <i>et al.</i> , 2000)	AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC	593
	ATGCCAACTTGACGTTAAAT	

* pares de base

Tabela 1

DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA EM FUNÇÃO DO GÊNERO E DIAGNÓSTICO PERIODONTAL				
	Saudável	Gengivite	Periodontite	Total
Masculino	4	11	18	33
Feminino	10	18	29	57
Total	14 (15,55%)	29 (32,22%)	47 (52,22%)	90

Tabela 2

DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL E NUMÉRICA DAS PREVALÊNCIAS BACTERIANAS OBSERVADAS EM FUNÇÃO DO DIAGNÓSTICO PERIODONTAL					
	Cr	Ec	Pg	Tf	Aa
Saudável	92,8(n=13)	7,0(n=1)	7,1(n=1)	7,1(n=1)	0,0(n=0)
Gengivite	96,5(n=28)	28,0(n=8)	10,3(n=3)	44,8(n=13)	14,0(n=4)
Periodontite	97,8(n=45)	41,0(n=19)	32,6(n=15)	71,7(n=33)	30,0(n=14)

significância estatística de 95% e com auxílio do Software BioEstat 2.0 for Windows.

RESULTADOS

A **tabela 1** mostra a distribuição da população estudada de acordo com o gênero e diagnóstico periodontal (AAP, 1999).

A **tabela 2** expressa a prevalência numérica e percentual encontrada para os patógenos periodontais de acordo com o diagnóstico periodontal.

A avaliação dos patógenos nos indivíduos periodontalmente saudáveis mostrou maior prevalência ($p < 0,05$) de *C. rectus*, seguido por *E. corrodens*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* e finalmente por *A. actinomycetemcomitans* (**tabela 2**).

Para o grupo com gengivite, *C. rectus* também foi a bactéria

mais prevalente ($p < 0,05$), porém, seguida primeiramente por *T. forsythia*, depois por *E. corrodens* e finalmente por *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* (**tabela 2**).

Já a avaliação dos indivíduos portadores de periodontite mostrou após *C. rectus*, *T. forsythia* como o patógeno mais prevalente ($p < 0,05$) seguido por *E. corrodens* e finalmente por *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* (**tabela 2**).

Foi proposta ainda, uma avaliação da presença isolada de cada patógeno periodontal em função do diagnóstico (**figuras 1 a 5**).

C. rectus não mostrou diferença estatisticamente significativa em sua prevalência em função do diagnóstico periodontal (**figura 1**).

Para *P. gingivalis* (**figura 3**), foi observada maior ($p < 0,05$) prevalência nos indivíduos portadores de periodontite em com-

Figura 1

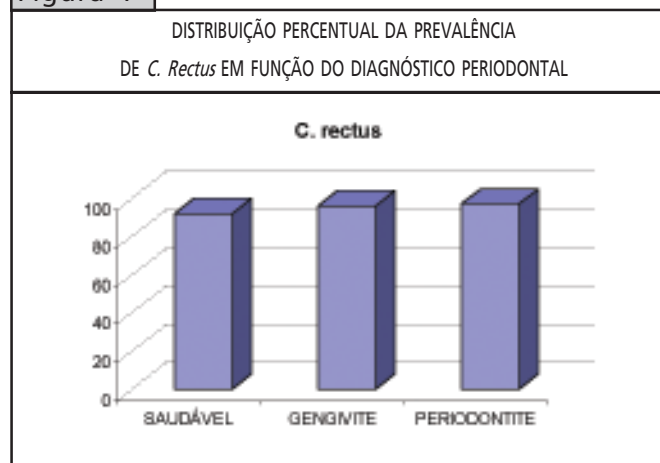
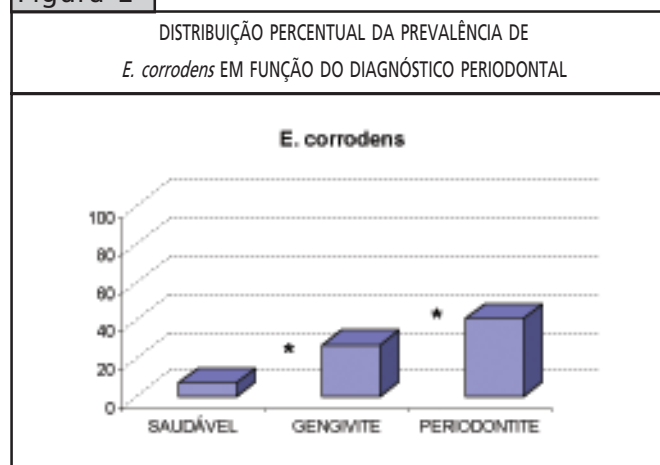


Figura 2



* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

paração aos periodontalmente saudáveis ou com gengivite, que apresentaram prevalência semelhante.

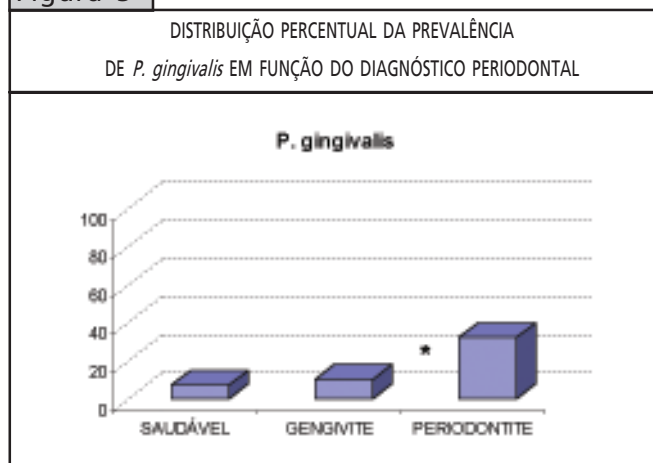
Comportamento similar foi observado para *E. corrodens* (figura 2), *T. forsythia* (figura 4) e *A. actinomycetemcomitans* (figura 5), onde a bactéria apresentou-se mais prevalente nos indivíduos portadores de periodontite, seguido pelos com gengivite e finalmente pelos periodontalmente saudáveis ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Epidemiologia é a ciência que estuda a distribuição das condições relacionadas aos estados de saúde e doença nas populações. No contexto moderno do estudo em saúde, constitui-se na mais importante ferramenta para conhecimento da natureza dos processos de doença, assim como os fatores que apresentam associação com os mesmos (OPPERMANN *et al*, 2005).

Estudos transversais são caracterizados pela observação direta de determinada população, selecionada ao acaso, em uma única oportunidade. O propósito deste tipo de estudo é a obten-

Figura 3



* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

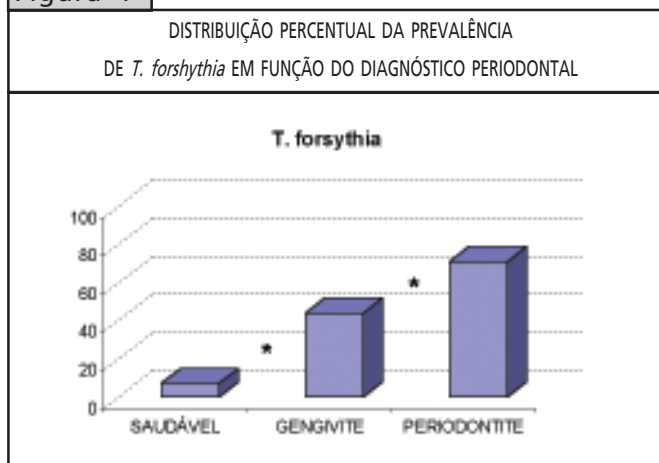
ção de dados de estimativas populacionais incluindo médias e prevalências, sendo estes estudos ainda úteis na elaboração de hipóteses etiológicas (CORTELLI *et al*, 2005).

No Brasil, a condução de estudos epidemiológicos, estabelecendo critérios de saúde-doença na população são freqüentes em Saúde Coletiva. Todavia, ao referirmos problemas específicos, entre eles do perfil periodontal destas populações observamos certa escassez de dados, dificultando comparações.

A avaliação da presença microbiana numa população em geral se justifica pela possibilidade da obtenção dos dados que, uma vez associados à outros parâmetros clínicos periodontais, como, por exemplo, avaliações de profundidade clínica de sondagem e do nível clínico de inserção, caracterizam o perfil periodontal dos indivíduos, estabelecendo as necessidades primárias de atendimento populacional e, posteriormente, medidas ideais para o controle da infecção periodontal e manutenção de saúde periodontal. Estas medidas uma, vez adotadas, trazem benefícios diretos à saúde bucal e, benefícios indiretos a saúde geral das pessoas. Assim, após o estabelecimento das condições clínicas periodontais da população incluída neste estudo, nossa proposta foi caracterizar o perfil microbiano destes indivíduos com o intuito de associar a prevalência bacteriana encontrada com o diagnóstico de saúde (indivíduos periodontalmente saudáveis), gengivite ou periodontite, beneficiando o planejamento terapêutico adotado.

Como na maioria dos estudos transversais a população alvo é extremamente numerosa, pode ser adotado o critério de avaliação de uma amostra. Esta medida foi estabelecida no presente estudo com alguns propósitos. Inicialmente necessitávamos de uma técnica microbiana que não requeresse microrganismos viáveis, pois, o local da coleta (Anápolis e Gurupi), dista muitas horas do Estado de São Paulo. Assim, adotamos a técnica de PCR. Um segundo aspecto observado foi minimizar recursos operacionais, tanto na alocação da amostra quanto nos proce-

Figura 4



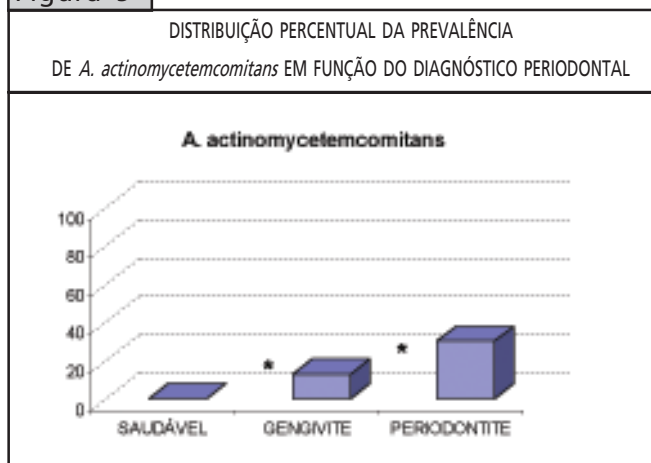
* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

dimentos laboratoriais. Além disso, a adoção da amostragem por conveniência não tinha como princípio generalizar conclusões, pelo grande viés de seleção, ao contrário, a proposta foi descrever o perfil microbiano associado ao diagnóstico clínico periodontal naquela população. Nossos resultados evidenciaram que a prevalência bacteriana dos patógenos *C. rectus*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* para os diferentes diagnósticos estabelecidos guardaram uma relação de prevalência de acordo com a gravidade da condição clínica encontrada (SLOTS, 1986; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994). Ou seja, para *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* observou-se um aumento no número de bactérias crescente dos indivíduos periodontalmente saudáveis para os diagnosticados com gengivite e, finalmente, com periodontite. Estes dados são semelhantes aos encontrados por van Winkelhoff (2002), Klein & Gonçalves (2003). Todavia, ao considerarmos *C. rectus*, este microrganismo mostrou-se altamente prevalente, independente da condição clínica encontrada. Este dado sugere que a *C. rectus* não se pode atribuir um valor preditivo significativo para o estabelecimento da condição periodontal.

CONCLUSÃO

Após a realização deste estudo, com características relevantes para as regiões de Anápolis e Gurupi concluímos que *C. rectus*, foi a bactéria mais prevalente, independente do diagnóstico periodontal, tendo sido encontrados *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. forsythia* e *A. actinomycetemcomitans* numa frequência dependente do diagnóstico de gengivite ou periodontite.

Figura 5



* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the presence of *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, and *T. forsythia* in 90 subjects periodontally healthy ($n = 14$), with gingivitis ($n = 29$) or periodontitis ($n = 47$). In all study population, subgingival samples of dental biofilm were collected and analyzed by polymerase chain reaction (PCR). ANOVA, Student *t* test and Wilcoxon test were performed to evaluate the presence of bacterium. *C. rectus* (92.8%), *P. gingivalis* (7.1%), *T. forsythia* (7.1%), *E. corrodens* (7.0%) and *A. actinomycetemcomitans* (0.0%) were observed in periodontally healthy subjects. In gingivitis subjects, we detected *C. rectus* (96.5%), *T. forsythia* (44.8%), *E. corrodens* (28.0%), *A. actinomycetemcomitans* (14.0%) and *P. gingivalis* (10.3%). Indeed, in periodontitis subjects, we observed *C. rectus* (97.8%), *T. forsythia* (71.7%), *E. corrodens* (41.0%), *P. gingivalis* (32.6%) and *A. actinomycetemcomitans* (30.0%). We failed to detect statistically significant difference between *C. rectus* in patients with different periodontal diagnoses, however, *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. forsythia* and *A. actinomycetemcomitans* were more prevalent in periodontitis subjects. According to our results it can be concluded that, *C. rectus* was the bacterium most prevalent in all subjects and, the frequency of *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. forsythia* and *A. actinomycetemcomitans* were dependent of gingivitis or periodontitis diagnosed.

UNITERMS: Bacteria, epidemiology, polymerase chain reaction, gingivitis, periodontitis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Alpagot T. Risk indicators for periodontal disease in a racially diverse urban population. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 982-988.
- 2- American Academy of Periodontology. Consensus report on periodontal disease: pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontology* 1996; 67: 926-932.
- 3- American Academy of Periodontology. *Annals of Periodontology* 1999; 4.
- 4- Arbes JR SJ, Beck JD. Epidemiologia das doenças gengivais e periodontais. In: *Periodontia Clínica*. Newman MG, Takei HH, Carranza FA. 9 ed. Vol 5. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p 66-83.
- 5- Ashimoto AC, Chen C, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11:266-273.
- 6- Ávila-campos MJ, Velásquez-meléndez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. *Rev Inst Trop S Paulo* 2002; 44:1 -5.
- 7- Cortelli JR, Cortelli SC, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 860-866.
- 8- Cortelli JR, Lotufo RFM, Oppermann RV, Sallum AW. Glossário da Sociedade Brasileira de Periodontologia. São Paulo: SOBRAPE, vol 15, n. 04, dez. 2005. 56p.
- 9- Dzink J, Socransky S, Haffajee A. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; 15:316-323.
- 10- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontol* 2000 1994; 5:78-111.
- 11- Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, Zambon JJ. Evidence of the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol* 2000; 71:912-22.
- 12- Klein MI, Gonçalves RB. Detection of *Tannerella forsythensis* and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with periodontal status. *J Periodontol* 2003; 74:798-802.
- 13- Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64:155-161.
- 14- Machion L, Freitas PM, Cesar Neto JB, Nogueira Filho, GR, Nociti Jr FH. A influência do sexo e da idade na prevalência de bolsa periodontais. *Pesq Odont Bras* 2000; 14:33-37.
- 15- Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. Review. *Annals of Periodontology* 1999; 4:7-19.
- 16- Novak MJ. Classificação das Doenças e Condições que Afetam o Periodonto. In: *Periodontia Clínica*. NEWMAN MG, TAKEI HH, CARRANSA FA. 9. ed. Vol 4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p 58-65.
- 17- Oppermann RV, Araújo MW, Costa F, Corraini P, Rosing CK, Susin C, Cortelli S. Epidemiologia das doenças periodontais. *Revista Periodontia* 2005; 15:63-76.
- 18- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 12:3770-3783.
- 19- Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Goene RJ, Abbas F, de Graff J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* 1990; 17:392-399.
- 20- Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1: 48-55.
- 21- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
- 22- Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: A historical perspective. *Periodontol* 2000 1994; 5:7-25.
- 23- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2001; 72:1354-1363.
- 24- Tran SD, Rudney JD, Sparks BS, Hodges JS. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. *J Periodontol* 2001; 72:1-10.
- 25- van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U.. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29:1023-1028.
- 26- Zambon JJ. Periodontal disease: Microbial factors. *Annals of Periodontology* 1996; 1:879-925.

Endereço para correspondência:

José Roberto Cortelli

Rua Visconde do Rio Branco, 51 - Sala 506.- Centro

CEP: 12020-040 - Taubaté - SP

E-mail: jrcortelli@uol.com.br