



**MESTRADO EM ODONTOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA**

**CLAUDIA REGINA JOAQUIM**

**INFLUÊNCIA DOS FATORES DE RISCO NOS NÍVEIS E PREVALÊNCIA**  
**DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE**  
**INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA**

Guarulhos  
2017

**CLAUDIA REGINA JOAQUIM**

**INFLUÊNCIA DOS FATORES DE RISCO NOS NÍVEIS E PREVALÊNCIA  
DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE  
INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos para  
obtenção do título de Mestre em Odontologia  
Área de Concentração: Periodontia  
Orientadora: Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte  
Co-orientadora: Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo

Guarulhos  
2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca**

J62i

Joaquim, Claudia Regina

Influência dos fatores de risco nos níveis e prevalência de patógenos periodontais no biofilme subgengival de indivíduos com periodontite crônica. / Claudia Regina Joaquim. -- 2017.

50 f.; 31 cm.

Orientadora: Profª. Dra. Poliana Mendes Duarte


Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2017.

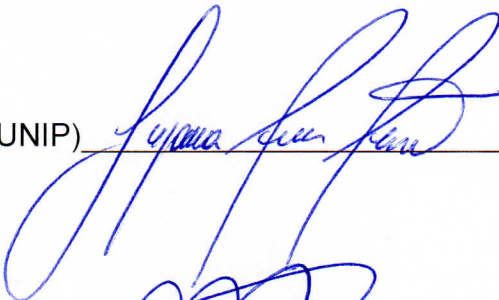
1. Periodontite Crônica 2. Diabetes Melito. 3. Tabagismo 4. Patógenos Subgengivais 5. Fatores de Risco I. Título II. Duarte, Poliana (Orientadora). III. Universidade Guarulhos

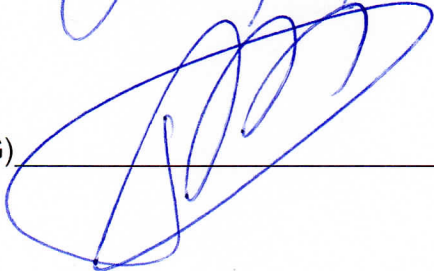
CDD. 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada “INFLUÊNCIA DOS FATORES DE RISCO NOS NÍVEIS E PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS PERIODONTAIS NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA” em sessão pública realizada em 22 de fevereiro de 2017, considerou a candidata CLAUDIA REGINA JOAQUIM aprovada.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte (UNG) 

2. Profa. Dra. Suzana Peres Pimentel (UNIP) 

3. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UNG) 

Guarulhos, 22 de fevereiro de 2017.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho à minha família, pelo incentivo de sempre, e por perdoar as ausências.

Ao meu esposo Ronaldo Iurovski, pela paciência, incentivo, imensa colaboração e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, professora Poliana Mendes Duarte, por quem desenvolvi admiração e respeito imensos. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação, paciência e amizade.

À amiga Tamires Miranda, pela incansável paciência e dedicação em todos os momentos da pesquisa. Muito obrigada pelo carinho e amizade sempre.

Aos professores do Centro de Pós-Graduação e Pesquisa do Curso de Odontologia da UNG, Magda Feres, Luciene Cristina de Figueiredo, Jamil Awad Shibli, Marcelo de Faveri, Marta Ferreira Bastos, Alessandra Cassoni Ferreira, Gabriela Giro Araújo, André Figueiredo Reis e José Augusto Rodrigues, pelo incentivo e ensinamentos.

Aos amigos, por perdoar as ausências e o mau humor.

Aos colegas do Mestrado e Doutorado da UNG pela companhia durante os módulos.

Aos funcionários da clínica de Pós-graduação da UNG sempre prontos a ajudar.

Aos alunos de iniciação científica Daniele Ferreira, Denise Paz, Letícia Macedo Marins, Matheus Guimarães, e Priscila Fontana pela colaboração e dedicação na pesquisa.

À técnica do Laboratório de Pesquisa em Odontologia II, Izilvânia Barreto, por toda ajuda e ensinamentos no laboratório.

Aos pacientes participantes, por terem contribuído para a realização desse estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização desse estudo.

## RESUMO

Já está bem estabelecido na literatura que indivíduos com diabetes melito (DM) e tabagistas apresentam risco aumentado para periodontite. No entanto, a microbiota subgingival de sítios equiparados para gravidade de doença periodontal não foi comparada entre fumantes e diabéticos até o presente momento. Além disso, atualmente, existem apenas poucas evidências sobre o impacto de ambas as condições conjuntamente sobre os patógenos subgingivais de pacientes com periodontite crônica (PC). Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do DM, do tabagismo e da associação de ambas as condições nos níveis e prevalência de patógenos subgingivais relevantes em pacientes com PC. Cem pacientes com PC generalizada foram alocados em um dos seguintes grupos: DM (n = 25): não-fumantes com DM tipo 2 não-controlada, S (n = 25): fumantes não-diabéticos, SDM (n = 25): fumantes com DM tipo 2 não-controlada e, Controle (n = 25): não-diabéticos e não-fumantes. Foram analisadas duas amostras de biofilme subgingival de sítios saudáveis (profundidade de sondagem [PS] e nível clínico de inserção [NCI]  $\leq 3$  mm e sem sangramento) e duas amostras de sítios doentes (PS e NCI  $\geq 5$  mm e sangramento à sondagem) para os níveis de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Eubacterium nodatum*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum ssp.* e *Prevotella intermedia*, por meio do PCR em tempo real. Não houve diferenças entre os grupos nas contagens médias das espécies bacterianas estudadas, considerando todos os sítios amostrados ( $p > 0,05$ ) e em suas prevalências nos sítios saudáveis e doentes ( $p > 0,05$ ). A contagem média de *P. micra* foi significativamente maior nos sítios rasos de ambos os grupos fumantes quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). As mulheres do grupo DM apresentaram níveis significativamente maiores de *F. nucleatum* do que as mulheres do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Em conclusão, a colonização subgingival pelas espécies bacterianas estudadas não é significativamente diferente entre indivíduos com PC apresentando DM e/ou tabagismo. Além disso, o DM e o tabagismo, conjunta e individualmente, não afetam consideravelmente os níveis subgingivais de patógenos periodontais relevantes em pacientes com PC.

**Palavras-chave:** Periodontite Crônica; Diabetes Melito; Tabagismo; Patógenos Subgingivais; Fatores de Risco

## ABSTRACT

It is clearly established that individuals with diabetes and smoking habit are at increased risk for periodontitis. However, the subgingival microbiota of sites matched for disease severity has not been compared between smokers and diabetics so far. In addition, to date, there is only minor evidence on the impact of both conditions jointly on the subgingival pathogens of patients with chronic periodontitis (CP). Therefore, the aim of this study was to compare the combined and individual effects of risk factors on the levels and prevalence of key subgingival periodontal pathogens in patients with chronic periodontitis (CP). One hundred patients with generalized CP were allocated into one of the following groups: DM (n=25): non-smokers with uncontrolled type 2 DM, S (n=25): non-diabetic heavy smokers, SDM (n=25): heavy smokers with uncontrolled type 2 DM and, Control (n=25): non-diabetic non-smokers. Two subgingival biofilm samples from healthy sites (probing depth [PD] and clinical attachment level [CAL]  $\leq$  3 mm and no bleeding) and two from diseased sites (PD and CAL  $\geq$  5 mm and bleeding on probing) were analyzed by quantitative PCR for *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Eubacterium nodatum*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum ssp.* and *Prevotella intermedia*. There were no differences among groups in the mean counts of the bacterial species studied, considering all sampled sites and in their prevalence in healthy and diseased sites ( $p > 0.05$ ). The mean *P. micra* count was significantly higher in the healthy sites of both smoking groups, than in those of the control group ( $p < 0.05$ ). The diseased sites of females of the DM group exhibited significantly higher levels of *F. nucleatum* than those of the control group ( $p < 0.05$ ). In conclusion, the subgingival colonization by the bacterial species studied is not significantly different in subjects with CP presenting risk factors. In addition, risk factors, jointly and individually, do not considerably affect the subgingival levels of key periodontal pathogens in patients with CP.

**Key-words:** Chronic Periodontitis; Diabetes Mellitus; Smoking; Pathogens; Risk Factors



## SUMÁRIO

1. Introdução	09
1.1. Fatores de risco para as doenças periodontais	09
1.2. Aspectos microbiológicos em pacientes diabéticos com periodontite	14
1.3. Aspectos microbiológicos em pacientes tabagistas com periodontite	17
2. Proposição	20
3. Artigo Científico	21
4. Conclusão	43
Referências Bibliográficas	44
Informativo	49
Anexo	50

## 1. Introdução

### 1.1 Fatores de risco das doenças periodontais

Periodontite é uma doença infecciosa causada por múltiplas espécies bacterianas que interagem entre si formando um ecossistema conhecido como biofilme e desencadeiam processos inflamatórios e imunológicos nos tecidos periodontais. A interação entre os microrganismos, seus produtos e a resposta do hospedeiro resultam em um processo destrutivo irreversível do periodonto de proteção (gengiva) e sustentação dos dentes (osso, cemento e ligamento) que pode culminar na perda do elemento dental (SOCRANSKY & HAFFAJEE 1994). Um estudo clássico de Socransky et al., publicado em 1998, sugeriu um agrupamento para as espécies bacterianas que abrigam o ambiente da bolsa periodontal em cinco complexos microbianos específicos baseado na interação entre as espécies e sucessão das mesmas durante a formação do biofilme. Três desses complexos microbianos (roxo, amarelo e verde) e o grupo dos *Actinomyces* são formados por espécies compatíveis com o hospedeiro, isto é, que foram associadas aos sinais clínicos de saúde periodontal. Os outros complexos, reconhecidos como laranja e vermelho, são compostos por espécies bacterianas associadas à doença, isto é, aos parâmetros clínicos de doenças periodontais como sangramento, profundidade de sondagem e perda de inserção clínica. As espécies *Fusobacterium nucleatum ssp.*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus* formam o complexo laranja. As espécies *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* são consideradas atualmente as mais periodontopatogênicas e formam o complexo vermelho. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, por sua vez, também é uma espécie bacteriana periodontopatogênica, mas que não está integrada a nenhum dos complexos descritos por Socransky et al. (1998).

Embora a etiologia bacteriana das periodontites esteja bem definida, diversos estudos científicos têm demonstrado que alguns fatores genéticos, sistêmicos e ambientais podem impactar negativamente no estabelecimento e curso das doenças periodontais. Neste contexto, o DM (diabetes melito) e o tabagismo são considerados verdadeiros fatores de risco para periodontites pois foi comprovado por meio de estudos longitudinais desenvolvidos em diferentes populações que a presença desses fatores aumenta de maneira dose-dependente a prevalência e gravidade das periodontites (KNIGHT et al. 2016).

DM é uma doença altamente prevalente, caracterizada por alterações metabólicas decorrentes de alterações na quantidade e/ou utilização da insulina, seja por sua quantidade

insuficiente secretada pelo organismo ou pela inibição/diminuição de sua ação, levando à um estado de hiperglicemia crônica. Em 2007, foi estimado que aproximadamente 6% da população adulta mundial possuía DM (MEETOO et al. 2007) e que, em menos de 30 anos, sua prevalência irá aumentar consideravelmente de modo que cerca de 366 milhões de pessoas serão portadoras da doença. De acordo com esses dados epidemiológicos, a maior prevalência de DM está relacionada aos homens, e sua alta prevalência parece estar relacionada ao aumento na proporção de pessoas com mais de 65 anos de idade (WILD et al. 2004). O DM tipo 2 é o tipo mais comum em adultos, perfazendo cerca de 90 a 95% da população diabética. Esse tipo de DM foi anteriormente denominado como não-insulino dependente pois acreditava-se que o uso diário de insulina exógena não era necessário para controlar a doença. Entretanto, esse tipo DM pode ser controlado por meio da dieta e/ou hipoglicemiantes orais sendo necessário muitas vezes a utilização de insulina exógena (GROSS et al., 2002), fazendo com que o termo não-insulino dependente tenha entrado em desuso.

Já está bem estabelecido que o DM gera alterações celulares e moleculares que interferem no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Como consequências diretas da hiperglicemia crônica ocorrem alterações sistêmicas macrovasculares, microvasculares, e complicações no reparo tecidual (TSOURDI et al. 2013). Dentre as alterações macrovasculares se destacam arteriosclerose, gangrena de membros inferiores e acidentes cerebrovasculares. Com relação às alterações microvasculares, além das retinopatias, neuropatias e nefropatias, destacam-se as alterações bucais como a periodontite crônica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS] 1999, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION-ADA 2013).

Ao longo dos últimos 40 anos, vários estudos foram desenvolvidos em diferentes populações com a intenção de identificar a influência do DM e da hiperglicemia nas doenças periodontais. Um dos estudos mais clássicos sobre esse assunto foi realizado por Emrich et al. (1991) e avaliou 1342 índios Pima no Arizona nos Estados Unidos com alta prevalência de DM. Os autores observaram que os índios portadores de DM apresentaram maior prevalência e gravidade na periodontite, quando comparados aos índios não diabéticos, com uma razão de chance (OR) de 3,43 vezes para a ocorrência de destruição do periodonto. Seppälä et al. (1993) observaram que pacientes diabéticos tipo 2 descompensados apresentavam mais gengivite e mais sangramento à sondagem que os diabéticos compensados, em 1 e 2 anos de acompanhamento. Neste mesmo ano, Oliver & Tervonen (1993) reportaram que indivíduos diabéticos apresentaram maior prevalência e extensão das bolsas periodontais, especialmente

aqueles com mau controle metabólico. Alguns anos mais tarde, em 2000, Sandberg et al. estudaram o estado de saúde bucal de suecos com diabetes tipo 2 e observaram que os mesmos apresentavam maior frequência de sítios com periodontite avançada quando comparados a não-diabéticos iguais para idade, gênero e localização geográfica. Tsai et al. (2002) avaliaram a associação entre o controle glicêmico do DM tipo 2 e a periodontite grave em população dos EUA, utilizando a base de dados do Estudo Nacional de Saúde e Nutrição III. Esses autores reforçaram ainda mais o conceito de que indivíduos com DM descontrolada apresentam uma prevalência significativamente maior de periodontite grave do que aqueles sem DM (OR = 2,90), após controle para variáveis de confundimento como idade, escolaridade, tabagismo e cálculo. De acordo com Torrungruang et al. (2005), o DM aumentou significativamente as probabilidades de adultos tailandeses apresentarem periodontite grave. Em 2005, Campus et al. avaliaram a relação entre DM e doença periodontal em 71 indivíduos diabéticos tipo 2 e 141 indivíduos não-diabéticos. Os resultados demonstraram que os indivíduos portadores de DM tipo 2 apresentaram um número significativamente maior de bolsas periodontais com profundidade de sondagem (PS) > 4 mm, além de níveis de placa e sangramento à sondagem (SS) mais elevados. Khader et al. (2006) conduziram uma revisão sistemática com meta-análise para verificar a associação entre o DM e as doenças periodontais por meio da comparação da extensão e gravidade das doenças periodontais entre diabéticos e não-diabéticos. Foram incluídos 23 estudos publicados entre janeiro de 1970 e outubro de 2003. De acordo com os resultados, diabéticos apresentavam higiene oral significativamente pior, maior gravidade da doença gengival e maior gravidade de doença periodontal medida pela média de PS e perda de inserção clínica. Corroborando achados anteriores, Kim et al. (2013) demonstraram que os parâmetros clínicos periodontais, a perda óssea dentária e a inflamação gengival foram significativamente influenciados pelo tempo de duração do DM em uma população sul-coreana. Além disso, altas taxas de hemoglobina glicada (HbA1c) e glicemia em jejum foram relacionadas a uma maior inflamação periodontal. Recentemente, Hong et al. (2016) verificaram que a prevalência de periodontite foi significativamente maior em adultos coreanos com DM (43,7%) comparado aos sem DM (25%). Eke et al. (2016) realizaram um estudo para determinar os perfis de risco médio/grave e não-grave para periodontite em adultos dos Estados Unidos. Em suporte aos estudos anteriores, esse estudo revelou que indivíduos com DM não-controlado apresentam maior probabilidade de desenvolver periodontite quando comparados aos sem DM.

A prevalência de indivíduos que consomem cigarros e outras formas de tabaco é bastante elevada em todo o mundo. De acordo com a OMS (WHO Media Centre, 2016), quase 6 milhões de pessoas em todo o mundo morrem anualmente pelo uso do tabaco, tanto pelo consumo direto como pelo fumo passivo. Existem estimativas que no ano 2020 este número crescerá para 7,5 milhões, contabilizando 10% de todas as mortes. Em 2010, estimou-se que cerca de 18% da população brasileira fumava, totalizando aproximadamente 25.569.000 pessoas. Se os esforços de controle ao consumo de tabaco continuarem na mesma intensidade, a OMS projeta que em 2025 cerca de 12% da população será fumante, isto é, aproximadamente 20.439.400 pessoas. A combustão do tabaco produz diversos constituintes citotóxicos e carcinogênicos, dos quais se destacam a nicotina, o monóxido de carbono e as substâncias oxidantes reativas pelas propriedades citotóxicas e com potenciais imunomodulatórios (TALHOUT et al. 2011, LEE et al. 2012). Já está comprovado por diversos estudos científicos que o consumo de tabaco causa o aumento do risco para diversas doenças sistêmicas em destaque para as doenças cardiovasculares, doenças obstrutivas pulmonares e cânceres de pulmão (JHA et al. 2006). Além do impacto deletério do tabaco na saúde sistêmica, o mesmo apresenta também efeitos maléficos na saúde oral, estando diretamente associado ao fracasso de implantes, aos cânceres orais e às doenças periodontais.

As primeiras observações de que existia associação entre o tabagismo e as doenças periodontais datam dos anos 40, quando Pindborg demonstrou que a gengivite ulcerativa necrosante estava associada com o consumo de tabaco (PINDBORG 1949). A partir dos anos 80, foram desenvolvidos vários estudos epidemiológicos em diversas populações reportando com maior força de evidência científica a forte associação entre o uso do tabaco e as doenças periodontais. Em geral essas evidências indicaram unanimemente uma maior prevalência, gravidade e progressão de periodontite em fumantes, uma vez que esses indivíduos apresentam níveis maiores de perda óssea, perda de inserção, perda dentária, recessão gengival e formação de bolsas periodontais, quando comparados aos não fumantes (BERGSTRÖN et al. 2000, HEITZ-MAYFIELD 2005). Logo, atualmente, o tabagismo é considerado um dos principais fatores de risco para as periodontites.

Em 1986, Løe et al. realizaram um dos estudos epidemiológicos mais clássicos da área de periodontia demonstrando que, em uma população de plantadores de chá do Sri Lanka, os indivíduos fumantes apresentaram maior gravidade e progressão de doença periodontal. Em 1994, Linden e Mullally pesquisaram a relação entre o tabagismo e a destruição periodontal em adultos jovens entre 20 e 33 anos. Os autores constataram que ambos os grupos apresentavam níveis semelhantes de placa, porém os fumantes apresentavam maiores níveis

de cálculo nas superfícies proximais, sangramento à sondagem e maior número de bolsas  $\geq 4$  mm, além de apresentarem mais sítios com perda de inserção  $\geq 2$ mm. Com base nos resultados, os autores concluíram que o tabagismo é o fator ambiental mais relacionado com a aceleração da destruição periodontal.

Em estudo prospectivo de 10 anos sobre a influência da exposição ao fumo na condição periodontal numa população de músicos, os resultados sugeriram que a saúde periodontal é comprometida pelo fumo crônico, o que foi evidenciado pelo aumento dos sítios periodontalmente doentes, concomitantemente com perda de altura óssea. A condição de saúde periodontal dos indivíduos ex-fumantes foi muito semelhante à encontrada nos indivíduos não-fumantes, sugerindo que parar de fumar é benéfico para a saúde periodontal (BERGSTROM et al. 2000). Mais tarde, em 2003, Bergström reafirmou que a doença periodontal era mais prevalente em fumantes, e relatou que o risco relativo associado ao tabagismo era dependente da definição da doença e de sua prevalência, demonstrando que uma definição mais restrita da doença (isto é, 1% de sítios com bolsas  $\geq 5$  mm) resultaria em baixa prevalência e elevado risco, e uma definição mais ampla (isto é, 15% de sítios com bolsas  $\geq 5$  mm) resultaria em alta prevalência e risco moderado de periodontite. Natto et al. (2005a) avaliaram a relação entre o tabagismo e a doença periodontal em uma população da Arábia Saudita. Os autores demonstraram que o fumo tanto de cigarro como de cachimbo estava associado à diminuição do sangramento marginal, à maiores níveis de profundidade de sondagem e de perda óssea periodontal. O risco relativo para a doença periodontal aumentou significativamente em 5,1 e 3,8 vezes nos fumantes de cachimbo de água e cigarros, respectivamente, em comparação com os não-fumantes.

Corroborando com a opinião de outros autores, Thomson et al. 2007 observaram que, em comparação com os não-fumantes, fumantes de longa duração apresentaram razão de chance de 7,1 vezes de mais que 1 sítio com perda de inserção  $> 5$ mm e eram mais propensos a terem incidência da doença após os 26 anos.

Em 2008, Lima et al. (2008) demonstraram que fumantes brasileiros com um consumo diário de pelo menos 10 cigarros por dia apresentaram maior perda de osso alveolar nos dentes anteriores, quando comparados aos indivíduos que nunca fumaram (média de perda óssea de 3,3mm e 2,2mm, respectivamente, obtida por medidas de radiografias periapicais). Mais tarde, em 2009, Vouros et al. (2009) avaliaram os possíveis fatores de risco relacionado à gravidade da destruição periodontal em uma população adulta grega. De acordo com os autores, o tabagismo foi o fator ambiental mais importante associado à destruição periodontal nesta população.

Na população brasileira, Susin et al. (2011) observaram que a prevalência de periodontite crônica variou entre 18,2% e 72% entre os indivíduos com idade entre 14 e 19 e entre 24 e 29 anos, respectivamente. Além disso, a presença de periodontite foi associada à idade, condição socioeconômica, presença de cálculo e tabagismo.

Katuri et al. (2016) avaliaram o efeito de diferentes formas de consumo de tabaco, com e sem fumaça, nos tecidos periodontais. Os autores relataram que dos 120 indivíduos avaliados que apresentavam o hábito de consumir tabaco, todos apresentaram condição periodontal precária, e que os usuários de tabaco sem fumaça apresentaram maior quantidade de perda de inserção clínica quando comparados aos fumantes. Recentemente, Khan et al. (2016) realizaram um estudo objetivando determinar a prevalência e a relação de dose-resposta entre os fumantes no Paquistão. Os pacientes fumantes eram em sua grande maioria adultos jovens, do gênero masculino e de baixo nível educacional. A prevalência de periodontite crônica entre os fumantes foi estimada em 81,6%, e o fumo pesado apresentou um elevado risco para o desenvolvimento de periodontite.

## **1.2. Aspectos microbiológicos de pacientes diabéticos com periodontite**

Uma vez que diversos estudos clínicos demonstraram que o DM e o tabagismo podem agravar a periodontite, investigações científicas utilizando técnicas de biologia molecular, de imunologia e microbiologia têm sido realizadas na tentativa de explicar a plausibilidade biológica associada à exacerbação da doença periodontal em fumantes e diabéticos. Alguns estudos têm focado nas possíveis diferenças na resposta imunoinflamatória entre pacientes portadores e não-portadores do risco frente à infecção bacteriana (BASTOS et al. 2016, KNIGHT et al. 2016). Na vertente microbiológica, por sua vez, diversos estudos objetivaram verificar o impacto do tabagismo ou do DM (tipo 1 e tipo 2) na microbiota periodontal, comparando os níveis/prevalência de patógenos periodontais entre fumantes e não-fumantes bem como entre diabéticos e não-diabéticos com periodontite por meio de diferentes técnicas microbiológicas.

Um dos primeiros estudos sobre a possível influência do DM na microbiota periodontal data de 1988. Neste ano, Zambon et al. examinaram amostras de biofilme subgingival de pacientes com periodontite e DM tipo 1 por meio de imunofluorescência indireta. É importante ressaltar que nesta época as espécies bacterianas tinham outra nomenclatura. De acordo com os autores, o *Streptococcus sanguinis* foi o microrganismo mais prevalente nas amostras em geral, encontrado em 75% dos sítios. Além disso, foi observada uma alta prevalência de bacteroides de pigmentação negra e uma elevada

proporção de *P. gingivalis*, anteriormente denominada *Bacteroides gingivalis*, em pacientes diabéticos quando comparado aos com exames de tolerância à glicose normal (ZAMBON et al. 1998).

Seppälä e Ainamo (1996) avaliaram a microbiota subgengival de indivíduos portadores de DM tipo 1 controlados e não-controlados, doentes há mais de 10 anos. Por meio de microscopia em campo escuro, os autores analisaram a presença de espécies dos tipos espiroqueta, bacilo móveis, bacilo não-móveis, cocos, filamentoso e fusiforme. De acordo com os resultados, a porcentagem de espiroquetas e bacilos móveis nos sítios periodontalmente doentes foi significativamente maior nos pacientes portadores de DM não-controlados, em comparação aos controlados. Além disso, os pacientes não-controlados apresentaram menor média de porcentagem de cocos nos sítios doentes comparados aos pacientes controlados.

Em 2001, Yuan et al. compararam a prevalência de cinco patógenos periodontais (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *T. denticola* e *Candida albicans*) em pacientes portadores de DM tipo 2 e pacientes não-diabéticos, utilizando o método de PCR. Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação à prevalência dos patógenos entre os grupos.

Hintao et al. (2007) compararam os níveis de algumas espécies bacterianas no biofilme supragengival, subgengival e saliva de diabéticos tipo 2 e não-diabéticos. De acordo com os resultados, um maior número de indivíduos diabéticos tiveram níveis mais elevados de *T. denticola*, *P. nigrescens*, *S. sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus intermedius* no biofilme supragengival, quando comparados aos não-diabéticos. Entretanto, nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada para os níveis desses microrganismos na saliva e na placa subgengival.

No ano seguinte, Ebersole et al. (2008) avaliaram a presença de microrganismos periodontais em hispânicos americanos com diabetes tipo 2. Em geral, os mesmos patógenos estavam presentes em sítios com periodontite de indivíduos com e sem DM tipo 2. Entretanto, os sítios com periodontite dos diabéticos apresentaram maior frequência de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *Campylobacter* spp. Ainda em 2008, Makiura et al. demonstraram que a espécie *P. gingivalis*, especialmente os clones com fimbrias tipo II, era detectada com maior frequência após tratamento periodontal de pacientes com controle glicêmico desfavorável.

Sardi et al. (2011), usando a técnica de PCR, observaram que diabéticos tipo 2 apresentaram maior prevalência de *Candida* spp., especialmente *C. albicans* e *C. dubliniensis*,



e menor frequência de *T. forsythia*, quando comparados aos não-diabéticos, sugerindo possíveis diferenças entre a microbiota de diabéticos e não-diabéticos. Field et al. (2012) avaliaram, por meio do PCR quantitativo em tempo real, os níveis de três espécies bacterianas periodontopatogênicas (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*) em amostras de biofilme subgengival de sítios periodontais rasos (PS <3mm) e profundos (PS >4mm) de diabéticos e não-diabéticos. De acordo com os autores, não houve diferenças significativas entre a microbiota subgengival de pacientes com e sem DM tipo 2.

Zhou et al. (2013) investigaram os efeitos do DM tipo 2 na composição do biofilme subgengival por meio de cultura e sequenciamento (*16S rDNA*). Os participantes foram separados em 4 grupos: indivíduos não-diabéticos sem periodontite, indivíduos não-diabéticos com periodontite, indivíduos portadores de DM e periodontite e indivíduos portadores de DM sem periodontite. Nos indivíduos com saúde periodontal, os níveis de 3 gêneros (*Prevotella*, *Pseudomonas* e *Tannerella*) foram significativamente diferentes entre os portadores de DM e os não-diabéticos. *Prevotella* e *Tannerella* estavam aumentados nas amostras sem periodontite dos não-diabéticos, enquanto *Pseudomonas* estava associado às amostras de indivíduos portadores de DM. *Actinobacteria* e *Proteobacteria* apareceram em maior abundância em amostras de periodontite de indivíduos portadores de DM, enquanto *Bacteriodes* estava mais abundante em amostras com periodontite de não-diabéticos. Além disso, *Propionibacteriaceae*, *Capnocytophaga sputigena* e *T. forsythia* estavam mais abundantes nas amostras de periodontite de indivíduos portadores de DM, comparado aos não-diabéticos. Baseados nesses dados, os autores concluíram que o DM pode alterar a composição bacteriana da placa subgengival.

Aemaimanan et al. (2013) avaliaram os níveis das espécies bacterianas do complexo vermelho e de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos com periodontite crônica portadores de DM, por meio do PCR quantitativo. Foram realizadas coletas de biofilme subgengival de indivíduos não-diabéticos, portadores de DM com controle glicêmico inadequado, e portadores de DM com controle glicêmico adequado. Foi observado que o controle glicêmico inadequado está associado ao aumento do número de bactérias do complexo vermelho no biofilme subgengival (*P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*). Ainda em 2013, Li et al. demonstraram alta prevalência e maiores quantidades de *T. denticola* e *T. forsythia* em chineses portadores de DM. Por outro lado, *P. intermedia* apresentou níveis menores em indivíduos portadores de DM quando comparado aos indivíduos sistemicamente saudáveis.

Castrillon et al. (2015) avaliaram, por meio do PCR, a presença das bactérias do complexo vermelho em pacientes com DM, comparativamente aos sem DM. Neste estudo, as

espécies do complexo vermelho foram detectadas em menor frequência nos pacientes diabéticos. Mohamed et al. (2016) compararam a influência da DM tipo 2 na ocorrência de 6 periodontopatógenos em amostras de biofilme, comparando pacientes com DM tipo 2 e periodontite crônica, pacientes com apenas periodontite crônica e paciente com apenas DM tipo 2. Os autores observaram o mais alto nível de prevalência de *P. gingivalis* (81,5%) no grupo de pacientes com apenas periodontite crônica. A prevalência de *T. forsythia* foi de 100% nos dois grupos com periodontite e 90% no grupo de DM. Entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos para nenhuma das espécies estudadas.

### 1.3 Aspectos microbiológicos em pacientes tabagistas com periodontite

Em relação à comparação dos aspectos microbiológicos periodontais entre fumantes e não-fumantes, os resultados disponíveis na literatura também são controversos pois alguns estudos demonstraram que o hábito de fumar pode afetar de alguma forma o ambiente subgengival, enquanto outros não observaram tal influência.

Umeda et al., em 1998, observaram, por meio da técnica de PCR, que os fumantes apresentaram um elevado risco (4,6 vezes) para colonização de bolsas periodontais por *T. denticola*. Esse estudo também sugere que a genética e/ou fatores ambientais podem predispor indivíduos à colonização oral de periodontopatógenos. Em 2000, Darby et al. avaliaram por meio do PCR a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *T. denticola* em pacientes com periodontite agressiva e crônica. Os autores não encontraram diferenças significativas na prevalência de nenhum dos periodontopatógenos avaliados entre fumantes e não-fumantes na população estudada.

Um ano mais tarde, Boström et al. (2001), utilizando a técnica de *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, também não relataram diferenças significativas nas taxas de detecção do complexo vermelho e outros patógenos (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *T. denticola*, *P. micra*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *S. noxia* e *S. intermedius*) entre indivíduos fumantes e não-fumantes. Ainda em 2001, Haffajee & Socransky observaram algumas diferenças significativas entre fumantes e não-fumantes com periodontite em relação à prevalência (% dos sítios colonizados) de algumas espécies, mas não em relação às suas contagens. Neste estudo, foi observada uma maior prevalência das espécies dos complexos laranja e vermelho nos sítios rasos de fumantes quando comparados aos não-fumantes, principalmente em bolsas rasas. Os autores sugeriram que a fumaça do cigarro pode afetar diretamente o ambiente do sulco gengival e das bolsas rasas, favorecendo a colonização por determinadas espécies. Finalmente, a maior prevalência

de patógenos periodontais colonizando bolsas rasas pode ser uma possível explicação para a maior gravidade de destruição periodontal nos fumantes. Outro estudo publicado em 2001, avaliou a presença e níveis de seis patógenos periodontais utilizando técnica de cultura anaeróbica. De acordo com os achados desse estudo, fumantes apresentaram maior prevalência e risco de colonização por espécies patogênicas como *T. forsythia*, *P. micra*, *F. nucleatum* e *C. rectus*. Logo, foi concluído que o tabagismo pode ser um fator determinante para a composição da microbiota subgengival em pacientes adultos com periodontite, e pode impactar na colonização das bolsas periodontais por um específico grupo de periodontopatógenos (VAN WINKELHOFF et al. 2001).

Natto et al. (2005b) avaliaram a relação entre a microbiota subgengival e diferentes hábitos de fumar. A prevalência de vários patógenos em pacientes fumantes de cigarro, narguilé e ambos foi avaliada por meio do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. De acordo com esse estudo, não foram observadas diferenças significativas entre fumantes de cigarros e/ou fumantes de narguilé e não-fumantes em relação à ocorrência dos microrganismos periodontais estudados. Em 2005, Apatzidou et al., com o objetivo de analisar o impacto do tabagismo nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos de pacientes adultos com periodontite, avaliaram amostras de biofilme subgengival por meio do método de PCR. Nenhuma diferença significativa na detecção dos supostos patógenos periodontais foi encontrada entre fumantes e não-fumantes. Em 2006, Gomes et al. compararam parâmetros microbiológicos de fumantes e não-fumantes com periodontite crônica. Por meio do PCR em tempo real, os níveis das espécies *P. gingivalis*, *P. micra*, *Dialister pneumosintes* e *A. actinomycetemcomitans* bem como a quantidade de bactérias totais foram quantificados em amostras de biofilme subgengival. De acordo com os resultados, fumantes, especialmente os pesados, apresentaram maior quantidade de *P. micra* e *D. pneumosintes* em bolsas moderadas e profundas.

Kubota et al. (2011), avaliando por PCR convencional a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, *T. denticola* e *C. rectus* em amostras de placa subgengival, não reportaram diferenças significativas na prevalência das bactérias do complexo vermelho entre japoneses fumantes e não-fumantes. Entretanto, a prevalência de *C. rectus* foi maior nos fumantes enquanto a do *A. actinomycetemcomitans* foi menor nos fumantes, quando comparado aos não-fumantes.

Heikkinen et al. (2012) visaram investigar se o hábito de fumar na adolescência afetaria a prevalência de bactérias periodontais. Para isso, os autores avaliaram amostras de biofilme subgengival pelo método de PCR em fumantes e não-fumantes. As prevalências de

*P. intermedia*, *T. forsythia* e *T. denticola* foram maiores em mulheres fumantes quando comparadas às não-fumantes. Além disso, *T. forsythia* e *T. denticola* foram mais frequentemente associadas ao sangramento à sondagem e bolsas profundas de fumantes em comparação às de não-fumantes. Em 2014, Guglielmetti et al. (2014) demonstraram que indivíduos fumantes apresentaram maiores quantidades de *P. gingivalis* e *T. forsythia*, quando comparados a pacientes que nunca fumaram. Os autores sugeriram que as diferenças na sensibilidade e especificidade de alguns dos métodos microbiológicos previamente usados, como PCR, PCR em tempo real, cultura e outras, e suas inerentes limitações podem explicar os achados divergentes em diferentes estudos. Camelo-Castillo et al. (2015) compararam amostras de biofilme subgingival de indivíduos saudáveis e não-fumantes, indivíduos com periodontite não-fumantes, e indivíduos com periodontite e fumantes usando uma técnica de biologia molecular denominada pirosequenciamento. Os resultados indicaram que a diversidade bacteriana da periodontite associada ao tabagismo é menor quando comparada aos não-fumantes, o que pode ser interpretado como consequência dos nutrientes disponíveis do microambiente da bolsa, ou a capacidade imune reduzida nestes pacientes. Os resultados indicaram, portanto, que o fumo exerce influência na ecologia periodontal.

É importante ressaltar que apesar de existirem vários estudos comparando a microbiota periodontal de indivíduos fumantes ou diabéticos em relação aos indivíduos não expostos aos fatores de risco, não existem, até o momento, muitas informações na literatura sobre o perfil microbiológico de indivíduos com periodontite crônica fumantes e diabéticos tipo 2, isto é, que apresentem ambos os riscos.

Um recente estudo realizado por Padmalatha et al. (2016) comparou os níveis de *P. gingivalis* em amostras de biofilme subgingival de pacientes diabéticos com periodontite com e sem o hábito de fumar. Os resultados demonstraram uma menor contagem dessa espécie em fumantes com DM. Os autores sugeriram que a redução significativa na contagem de *P. gingivalis* nos diabéticos-fumantes pode ser atribuída às alterações locais, incluindo a presença de substâncias tóxicas como a nicotina que impediriam o crescimento dessa bactéria. É importante salientar que os autores utilizaram um espectrofotômetro ultravioleta-visível para detecção de DNA dessa espécie.

## **2. Proposição**

O objetivo deste estudo foi comparar o impacto dos fatores de risco individualmente ou combinados nos níveis e prevalência de patógenos subgengivais em pacientes com periodontite crônica.

### 3. Artigo Científico

#### **The combined and individual impact of risk factors on key subgingival periodontal pathogens**

Claudia Regina Joaquim<sup>1</sup>, Tamires Szeremeske Miranda<sup>1</sup>, Letícia Macedo Marins<sup>1</sup>, Hélio Doyle Pereira da Silva<sup>1</sup>, Magda Feres<sup>1</sup>, Luciene Cristina Figueiredo<sup>1</sup>, Poliana Mendes Duarte<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Periodontology, Dental Research Division, Guarulhos University, São Paulo, Brazil.

**Running title:** Impact of risk factors on periodontal pathogens

**Key-words:** Chronic periodontitis; diabetes mellitus; smoking; pathogens; real-time polymerase chain reaction, risk factors

Address for correspondence (fax number and e-mail can be published):

Poliana Mendes Duarte

Universidade Guarulhos - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

Praça Tereza Cristina, 229 - Centro

Guarulhos - SP - Brazil

Zip code: 07.023-070

Telephone number: +55 (11) 2464-1758

Fax number: +55 (11) 2464-1758

e-mail: [pduarte@ung.br](mailto:pduarte@ung.br)

**Source of funding:** São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil, # 2013/23743-9; 2013/10354-4).

## Abstract

**Aim:** The aim of this study was to compare the combined and individual effects of risk factors on the levels and prevalence of key subgingival periodontal pathogens in patients with chronic periodontitis (CP). **Materials and methods:** One hundred patients with generalized CP were allocated into one of the following groups: DM (n=25): non-smokers with uncontrolled type 2 DM, S (n=25): non-diabetic heavy smokers, SDM (n=25): heavy smokers with uncontrolled type 2 DM and, Control (n=25): non-diabetic non-smokers. Two subgingival biofilm samples from healthy sites (probing depth [PD] and clinical attachment level [CAL]  $\leq$  3 mm and no bleeding) and two from diseased sites (PD and CAL  $\geq$  5 mm and bleeding on probing) were analyzed by quantitative PCR for *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Eubacterium nodatum*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum ssp.* and *Prevotella intermedia*. **Results:** There were no differences among groups in the mean counts of the bacterial species studied, considering all sampled sites and in their prevalence in healthy and diseased sites ( $p > 0.05$ ). The mean *P. micra* count was significantly higher in the healthy sites of both smoking groups, than in those of the control group ( $p < 0.05$ ). The diseased sites of females of the DM group exhibited significantly higher levels of *F. nucleatum* than those of the control group ( $p < 0.05$ ). **Conclusions:** The subgingival colonization by the bacterial species studied is not significantly different in subjects with CP presenting risk factors. In addition, risk factors, jointly and individually, do not considerably affect the subgingival levels of key periodontal pathogens in

## **Introduction**

The detrimental effects of diabetes mellitus (DM) and smoking on periodontal tissues have long been reported by several clinical studies performed in different populations. Both DM and tobacco smoking are recognized as major risk factors for destructive periodontal diseases, as diabetics and smokers evidently experience higher incidences, severity and progression of periodontitis than non-smokers and non-diabetic patients (Emrich et al. 1991, Heitz-Mayfield 2005, Novak et al. 2008, Eke et al. 2016).

Although the harmful clinical impacts of DM and smoking on periodontal diseases is well established, the actual mechanisms by which these modifying factors lead to the exacerbation of periodontal destruction are not fully understood. Evidence has suggested that DM and smoking might affect the cellular and molecular components of the inflammatory and innate and adaptive immune responses, which may explain, at least in part, their local effects on the periodontal tissues (Duarte et al. 2014, Johannsen et al. 2014, Knight et al. 2016). Therefore, given the differences in clinical and immunoinflammatory periodontal parameters between smokers and non-smokers, as well as between diabetic and non-diabetics, it is hypothesized that these risk factors might also lead to changes in the subgingival microbiota.

Using different microbiological techniques, several studies have compared the levels and/or prevalence of subgingival pathogens between smokers and non-smokers and between diabetic and non-diabetic patients (Darby et al. 2000, Boström et al. 2001, Haffajee & Socransky 2001, Yuan et al. 2001, Apatzidou et al. 2005, Ebersole et al. 2008, Kubota et al. 2011, Field et al. 2012, Aemaimanan et al. 2013, Casarin et al. 2013, Zhou et al. 2013, Guglielmetti et al. 2014, Camelo-Castilho et al. 2015). However, these results remain controversial and undefined. Some investigations have shown that the subgingival biofilm does not differ between smokers and non-smokers and between diabetic and non-diabetic



patients (Preber et al. 1992, Darby et al. 2000, Boström et al. 2001, Yuan et al. 2001, Apatzidou et al. 2005, Hintao et al. 2007, Field et al. 2012). On the other hand, other studies have proposed that the smoking habit and DM might modify the levels and/or prevalence of some pathogens, to some extent (Haffajee & Socransky 2001, Gomes et al. 2006, Ebersole et al. 2008, Kubota et al. 2011, Sardi et al. 2011, Casarin et al. 2013, Aemaimanan et al. 2013, Zhou et al. 2013, Guglielmetti et al. 2014, Camelo-Castilho et al. 2015). Up to the present time, the subgingival microbiota of sites matched for disease severity has not been compared between smokers and diabetics with periodontitis. In addition, only minor evidence has related the impact of both conditions combined on the subgingival pathogens of patients with chronic periodontitis (CP) (Padmalatha et al 2016). Therefore, the aim of this study is to compare the combined and individual effects of risk factors on the levels and prevalence of key subgingival periodontal pathogens in patients with CP.

## **Material and Methods**

### **Study Population**

Patients with generalized CP were consecutively selected from the population seeking treatment in the Periodontal Clinic of Guarulhos University (Guarulhos, SP, Brazil) and distributed into one of the following groups: DM: non-smokers with uncontrolled type 2 DM, S: non-diabetic heavy smokers, SDM: heavy smokers with uncontrolled type 2 DM and, Control: non-diabetic non-smokers. All eligible individuals were invited to participate in the study, thoroughly informed of its nature, potential risks and the benefits of their participation in the study and signed an informed consent. During the screening of volunteers, detailed medical and dental histories were obtained. All volunteers received clinical and microbiological assessment and were referred to the University Dental Clinic in order to receive periodontal treatment. The levels of glycated hemoglobin (HbA1c; High-performance Liquid Chromatography method) and fasting plasma glucose (FPG; Glucose Oxidase method)

were assessed for all patients by the Guarulhos University Clinical Analysis Laboratory during screening. This study protocol was previously approved by Ethics Committee in Clinical Research of the Guarulhos University (CAAE: 25526913.8.0000.5506).

#### **Inclusion criteria**

**General** - All patients were > 30 years old, had at least 15 teeth, excluding third molars and had generalized CP. Generalized CP was defined as > 30 % of sites with concomitant probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL)  $\geq$  4 mm and bleeding on probing (BoP) (Armitage 1999), and a minimum of six teeth distributed in the four quadrants presenting at least one site with PD and CAL  $\geq$  5 mm and BoP.

**Smokers** – Cigarette smoking history (frequency and duration) was obtained by questionnaire. For inclusion in the study, the smokers were required to be non-diabetics and smoke at least 10 cigarettes per day for at least the past 10 years.

**Diabetic patients** - Data concerning the duration of DM was retrieved from the medical records. For inclusion in the study, the diabetic subjects required a current diagnosis of DM that was confirmed by a physician, dating from at least 3 years prior to the study. In addition, all diabetic patients were required to have a glycated HbA1c > 6.5% and FPG > 99 mg/dl.

**Control patients** - Patients with no history of DM or smoking. All non-diabetic patients were required to have HbA1c  $\leq$  6.0% and FPG < 99 mg/dl.

#### **Exclusion criteria**

Exclusion criteria were: pregnancy, lactation, subgingival periodontal therapy including non-surgical and surgical scaling and root planing during the previous 12 months, use of antibiotic, anti-inflammatory, immunosuppressive therapies during the previous 6 months, regular use of mouthrinses containing antimicrobials, use of orthodontic appliances, presence of other systemic conditions that could affect the progression of periodontitis (e.g. immunological disorders, osteoporosis) and major complications of DM (i.e. cardiovascular

and peripheral vascular diseases [ulcers, gangrene and amputation], neuropathy and nephropathy).

#### **Periodontal measurements and calibration exercise**

One examiner (T.S.M) performed all clinical examinations. The following parameters were assessed at six sites (mesio-buccal, mid-buccal, disto-buccal, mesio-lingual, mid-lingual, disto-lingual) per tooth, excluding third molars, using a manual periodontal probe (UNC15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA): visible plaque accumulation (1/0), BoP (1/0), marginal bleeding (MB; 1/0), PD (mm) and CAL (mm). Calibration was performed according to the protocol proposed by Araujo et al. (2003), and the standard error of measurement (SE) was calculated. The examiner participated in a calibration exercise and examined one quadrant with at least 6 teeth in 10 non-study patients with CP. Initially, the examiner measured PD and CAL in a given quadrant and 60 minutes later, this same procedure was repeated. Therefore, all 10 patients were probed twice in the same visit by the examiner. Upon completion of all measurements, the intra-examiner variability for PD and CAL measurements were assessed. The intra-examiner variability was 0.22 mm for PD and 0.23 mm for CAL. The agreement for categorical variables [i.e. BoP, MB and plaque] was 94% (Kappa-light test).

#### **Microbiological analysis**

After supragingival plaque removal, subgingival biofilm samples were collected with individual sterile mini-Gracey curettes from four non-contiguous sites per subject that presented no furcation involvement and prosthesis and that were distributed in different quadrants. Two sites from each of the following categories were sampled: PD and CAL  $\leq$  3 mm with no BoP and no MB (healthy sites) and PD and CAL  $\geq$  5 mm with BoP (diseased sites). The samples were immediately placed in individual microtubes containing 0.15 ml of TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.6).

### **Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Test (qPCR)**

The samples were analyzed individually for the levels and presence of seven bacterial species (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Eubacterium nodatum*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum ssp.* and *Prevotella intermedia*) by qPCR, using a LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

DNA was extracted from each biofilm sample using the MasterPure™ complete DNA and RNA purification kit (Epicentre, Madison, WI, USA). Amplification reactions were performed in a 10µL final volume, containing 2.5µL of the isolated DNA (20 ng/µL) and a reaction mixture containing the primer probe sets (2.5µM each) and the FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH). Absolute quantification of target species in each sample was performed using standard curves prepared with reference strains (Table 1). The determination of DNA content in controls was based on the genome size of each species and the mean weight of one nucleotide pair (Dolezel et al. 2003). Based on standard curves, individual sample Ct scores were converted into the number of bacterial cells. The level of detection was set to 10<sup>3</sup> bacteria. PCR procedures were performed in a blinded fashion. The specific primers used for the detection of each bacterial species evaluated and the amplification profiles are described in Table 1.

### **Statistical Analysis**

The sample size was based on a previous study (Aemaimanan et al. 2013) that compared the levels of the three species of the red complex in healthy and diseased periodontal sites between uncontrolled type 2 diabetic patients and non-diabetic patients, using real time PCR. According to the aforementioned study, 19 patients per group would be enough to detect differences among groups in the species of the red complex. However, since 25 subjects per group met the inclusion criteria during the period of patient recruitment, all of these individuals entered this study.

The mean percentages of sites with plaque accumulation and BoP, the mean full-mouth PD and CAL, the mean levels of the bacterial species studied, the levels of HbA1c, and the age and the duration of DM were computed for each subject and, subsequently, across groups. The mean levels of the bacterial species at healthy sites and diseased sites were determined separately for each subject and then across each group. Data were examined for normality by Shapiro-Wilk test and non-parametric methods were used for data that did not achieve normal distribution. The significance of differences for age was compared using ANOVA. The significance of differences for periodontal parameters and HbA1c was compared using the Kruskal Wallis test, followed by the Dunn test. The t-test was used to compare years of cigarette smoking, number of cigarettes smoked per day and duration of DM. The significance of differences for gender and the prevalence of the bacterial species studied in healthy and diseased sites were compared by the Chi-square test. Microbiological data were first transformed using Box-Cox to correct for asymmetry, generate normal distribution of the data and stabilize variance. Subsequently, microbiological data were analyzed using mixed-model ANOVA for the comparison of levels of individual bacteria species with adjustments for age and gender, using individuals as the random effect and smoking, DM and smoking plus DM as fixed effects (SAS PROC MIXED, SAS 9.1.2, SAS Institute Inc., Cary, NC). Subsequently, post hoc analyses with the Bonferroni correction were performed. The residual analysis validated the assumed models. These microbiological analyses were performed considering all sampled sites and the healthy and diseased sites separately. The microbiological counts were expressed as  $\log^{10}$ . The level of significance was set at 5%.

## **Results**

This study was conducted between March 2014 and September 2016. One hundred patients ranging from 34 to 70 years of age were selected out of almost 600 screened, totalizing 25 patients per group. Samples from three patients of the SDM group, three

patients of the control group and one patient of the S group were not analyzed, due to DNA extraction issues.

### **Clinical and demographic parameters**

There were no differences among groups for gender distribution, age and clinical parameters at full-mouth and sampled site levels ( $p>0.05$ ). As expected, HbA1c levels were significantly higher in the two groups with DM than in the control and S groups ( $p< 0.05$ ; Table 2). DM treatment included diet regimen and the use of oral hypoglycemic agent (metformin) and did not differ between the diabetic groups (data not shown).

### **Microbiological parameters**

Table 3 presents the mean number of periodontal pathogens, considering all sampled sites. There were no differences in the mean numbers of all bacterial species studied among groups, considering all sampled sites ( $p>0.05$ ). Table 4 presents the mean number of periodontal pathogens for the healthy sites only. There were no differences among groups for the mean numbers of almost all bacterial species studied ( $p>0.05$ ), except for the mean levels of *P. micra* that were statistically significantly higher in the healthy sites of both cigarette smoking groups than in those of the control group ( $p<0.05$ ). Table 5 presents the mean number of periodontal pathogens for the diseased sites. In general, there were no differences among groups with regard to the mean numbers of the bacterial species studied in diseased sites ( $p>0.05$ ). However, there was a significant interaction between groups and the covariate gender for the levels of *F. nucleatum ssp* ( $p<0.05$ ). Females, but not males, from the DM group exhibited significantly higher levels of this specie than females from the control group. The percentages of healthy and diseased sites colonized by periodontal pathogens are presented in Table 6. No differences in the prevalence of all bacterial species studied were observed among groups ( $p<0.05$ ).

## Discussion

This study compared, for the first time, the levels and prevalence of relevant periodontal pathogens among patients presenting one or both of the major risk factors for periodontitis (DM and smoking). The overall results indicate that the subgingival colonization by the bacterial species studied is not significantly different between subjects with CP presenting risk factors. When compared to the controls without any risk factor, the only significant differences were the increased counts of *P. micra* in the healthy sites of both cigarette smoking groups and of *F. nucleatum ssp* in the diseased sites of females with DM. Therefore, it appears that risk factors, jointly and individually, do not considerably affect the subgingival colonization of key periodontal pathogens in patients with CP.

In the current study, sites matched for clinical parameters (i.e. PD, CAL and bleeding) in patients with CP presenting cigarette smoking, type 2 DM and both conditions exhibited no significant differences in their prevalence and levels of any bacterial species studied. Furthermore, only punctual differences were observed between these risk groups and the control group. These findings suggest that risk factors, together or individually, present a comparable and non-significant impact on key subgingival periodontal pathogens. To date, no study has directly compared the periodontal microbiota of smoking- and DM-related periodontitis. A recent study (Padmalatha et al. 2016) focused on the evaluation of the possible involvement of *P. gingivalis* in DM-related periodontitis, associated or not with tobacco use. In contrast with the current study, the authors observed increased counts of *P. gingivalis* in patients with DM and reduced levels of this species in diabetic patients maintaining a smoking habit. It has been suggested that the tobacco contents could change the periodontal environment, inhibiting the growth of *P. gingivalis*. However, the aforementioned study (Padmalatha et al. 2016) evaluated newly diagnosed cases of DM, did not study a group

of smoking only individuals, and did not report the clinical characteristics of the sampled sites nor the duration and level of control of DM or the frequency and duration of tobacco use.

Hypothetically, the increased glucose levels and the presence of cigarette contents in the sulcus/pocket environment could selectively modulate bacterial growth. However, in the current study, in contrast to some previous investigations, no significant differences in counts of the species evaluated were observed between smokers and non-smokers, nor between the diabetic and non-diabetic subjects (Haffajee & Socransky 2001, Gomes et al. 2006, Ebersole et al. 2008, Kubota et al. 2011, Sardi et al. 2011, Casarin et al. 2013, Aemaimanan et al. 2013, Zhou et al. 2013, Guglielmetti et al. 2014, Camelo-Castilho et al. 2015). One of the few differences observed was that healthy sites (i.e. PD and CAL  $\leq$  3 mm with no BoP) of smokers with and without DM harbored higher counts of the orange complex species, *P. micra*, when compared to those of control patients. These findings are in agreement with those of previous studies that also observed a relationship between the presence of *P. micra* and smoking habit in patients with periodontitis, employing cultures (van Winkelhoff et al. 2001), checkerboard DNA-DNA hybridization (Haffajee & Socransky 2001) and real time PCR (Gomes et al. 2006). Remarkably, Haffajee & Socransky (2001) reported an increased extent of *P. micra* colonization, predominantly at sites with PD < 4 mm, in smokers compared to non-smokers. These findings may indicate that cigarette compounds can affect the colonization of periodontal sites by *P. micra*, especially at shallow sites. Further studies are required to confirm this hypothesis and to test the clinical consequence of this microbiological finding.

Another statistically significant difference found in the current study was the increased levels of *F. nucleatum ssp* in the diseased sites of females with DM, when compared to controls. Although this orange complex species is recognized for its ability to aggregate with other pathogens in periodontal diseases and act as a bridge between early and



late colonizers (Signat et al. 2011, Han 2015), few studies have evaluated its levels in the subgingival environment of patients with DM. Field et al. (2012), using real time PCR, found no differences in the counts and prevalence of *F. nucleatum* between diseased sites of subjects with and without type 2 DM. On the other hand, Casarin et al. (2013), using sequencing, observed higher percentages of *F. nucleatum* in diseased sites of subjects with DM than in non-diabetic subjects. In addition, Sakalauskiene et al. (2014) reported that *F. nucleatum* were identified more frequently in the type 1 DM subjects than in systemically healthy subjects. However, it is important to highlight that these studies did not take into account the possible impact of gender. In fact, divergences among studies regarding the effects of DM and smoking on the subgingival microbiota might be explained by differences in sample size, sampling procedures (paper points or curettes; individual or pooled samples), depth of sampled sites, sensitivity and specificity of the microbiological technique (culture, DNA probes, conventional PCR, real-time PCR, sequencing, checkerboard DNA-DNA hybridization, immunofluorescence microscopy), types of species studied, method of data expression (proportion, prevalence or counts), exclusion or adjustment for confounders (age, gender), severity of hyperglycemia and duration and frequency of smoking habit.

As neither cigarette smoking nor DM, nor the association of both conditions, profoundly affected the subgingival levels of the seven key periodontal pathogens studied, the more severe periodontal destruction observed in diabetics and smokers does not seem to be caused by alterations in the presence of these species. Therefore, plausible speculations for the exacerbated periodontitis in these risk groups might be the presence of microorganisms other than the seven targeted species and/or the detrimental alterations in the immune-inflammatory response against pathogens in diabetics and smokers. For this reason, more studies on this topic are still required.

The main strength of this study is that it is the first to compare the prevalence and levels of the three species of the red complex and four more species of the orange complex among patients with CP with individual and combined risk factors. Furthermore, four sites matched for clinical parameters were analyzed individually per group, providing a view of the microbiological aspects of healthy and diseased periodontal sites in these patients. Finally, the statistical analyses were adjusted for age and gender, avoiding the interference of these important confounding factors in the results. A limitation of the current study is that the microbiological analysis was limited to seven periodontal species. It is recognized that dental biofilm is a polymicrobial community with several frequently co-inhabiting microorganisms. Therefore, a broader microbiological evaluation, possibly including host-compatible species, would be important to provide the actual combined and individual impact of risk factors on the subgingival microbial profile of subjects with CP. In addition, despite the high sensitivity of real time PCR, its cost and time demands limited the evaluation of a larger number of samples.

In conclusion, the subgingival colonization by *T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *E. nodatum*, *P. micra*, *F. nucleatum ssp.* and *P. intermedia* was not significantly different between subjects with CP presenting risk factors. In addition, risk factors, jointly and individually, did not considerably affect the subgingival levels of key periodontal pathogens in patients with CP.

## References

Aemaimanan P, Amimanan P, Taweechaisupapong S. Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis. *Anaerobe*. 2013 Aug;22:64-8.

Al-Hebshi NN, Al-Sharabi AK, Shuga-Aldin HM, Al-Haroni M, Ghandour I. Effect of khat chewing on periodontal pathogens in subgingival biofilm from chronic periodontitis patients. *J Ethnopharmacol*. 2010 Dec 1;132(3):564-9.

Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Sep;32(9):973-83.

Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. *J Periodontol*. 2003; 74:1736-1740.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):1-6.

Boström L, Bergström J, Dahlén G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001 Mar;28(3):212-9.

Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Donos N, Tomás I. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Front Microbiol*. 2015 Feb 24;6:119.

Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, Duarte PM, Casati MZ, Gonçalves RB. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol Res*. 2013 Feb;48(1):30-6.

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol*. 2000 Jun;27(6):417-24.

Duarte PM, Bezerra JP, Miranda TS, Feres M, Chambrone L, Shaddox LM. Local levels of inflammatory mediators in uncontrolled type 2 diabetic subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014 Jan;41(1):11-8.

Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A*. 2003 Feb;51(2):127-8.

Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2008 Apr;79(4):637-46.

Eke PI, Wei L, Thornton-Evans GO, Borrell LN, Borgnakke WS, Dye B, Genco RJ. Risk Indicators for Periodontitis in US Adults: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2016 Oct;87(10):1174-85.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1991 Feb;62(2):123-31.

Field CA, Gidley MD, Preshaw PM, Jakubovics N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontal Res.* 2012 Aug;47(4):470-8.

Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, Marcantonio RA. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2006 Sep;77(9):1483-90.

Guglielmetti MR, Rosa EF, Lourenção DS, Inoue G, Gomes EF, De Micheli G, Mendes FM, Hirata RD, Hirata MH, Pannuti CM. Detection and quantification of periodontal pathogens in smokers and never-smokers with chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2014 Oct;85(10):1450-7.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2001 May;28(5):377-88.

Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol.* 2015 Feb;23:141-7.

Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:196-209.

Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Jun;22(3):175-81.

Johannsen A, Susin C, Gustafsson A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. *Periodontol 2000.* 2014 Feb;64(1):111-26.

Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM Jr, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2016 Jun;71(1):22-51.

Kubota M, Tanno-Nakanishi M, Yamada S, Okuda K, Ishihara K. Effect of smoking on subgingival microflora of patients with periodontitis in Japan. *BMC Oral Health.* 2011 Jan 5;11:1.

Miranda TS, Feres M, Perez-Chaparro PJ, Faveri M, Figueiredo LC, Tamashiro NS, Bastos MF, Duarte PM. Metronidazole and amoxicillin as adjuncts to scaling and root planing for the treatment of type 2 diabetic subjects with periodontitis: 1-year outcomes of a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2014 Sep;41(9):890-9.

Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Methods.* 2004 Oct;59(1):117-25.

Novak MJ, Potter RM, Blodgett J, Ebersole JL. Periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2008 Apr;79(4):629-36.

Padmalatha GV, Bavle RM, Satyakiran GV, Paremala K, Sudhakara M, Makarla S. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* in chronic periodontitis patients associated with diabetes mellitus using real-time polymerase chain reaction. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016 Sep-Dec;20(3):413-418.

Preber H, Bergström J, Linder LE. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol*. 1992 Oct;19(9 Pt 1):667-71.

Sakalauskiene J, Kubilius R, Gleiznys A, Vitkauskiene A, Ivanauskiene E, Šaferis V. Relationship of clinical and microbiological variables in patients with type 1 diabetes mellitus and periodontitis. *Med Sci Monit*. 2014 Oct 8;20:1871-7.

Sardi JC, Duque C, Camargo GA, Hofling JF, Gonçalves RB. Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis--a pilot study. *Arch Oral Biol*. 2011 Oct;56(10):1098-105.

Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol*. 2011;13(2):25-36.

van Winkelhoff AJ, Bosch-Tijhof CJ, Winkel EG, van der Reijden WA. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol*. 2001 May;72(5):666-71.

Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. *J Periodontal Res*. 2001 Feb;36(1):18-24.

Zhou M, Rong R, Munro D, Zhu C, Gao X, Zhang Q, Dong Q. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One*. 2013 Apr 22;8(4):e61516.

Table 1 - Primer sequences, amplification profile and estimated length of PCR product for each bacterial species.

Species/reference strain	Sequence	Amplification profile [temperature (°C)/time (s)]	Length of PCR product (bp)
<i>P. intermedia</i> /ATCC 25611 Miranda et al. (2014)	5' CCACATATGGCATCTGACGTG 3' TCAATCTGCACGCTACTTGGC	95/10, 59/10, 72/10	233
<i>P. gingivalis</i> /ATCC 33277 Nonnenmacher et al. (2004)	5' TGCAACTTGCCTTACAGAGGG 3' ACTCGTATCGCCCCGTTATTC	95/10, 57/10, 72/14	344
<i>T. forsythia</i> /ATCC 43037 Al-Hebshi et al. (2010)	5' GATAGGCTTAACACATGCAAGTC 3' GTTGCGGGCAGGTTACATAC	95/10, 57/10, 72/4	99
<i>E. nodatum</i> /ATCC 33099 Miranda et al. (2014)	5' CTTCGGAACAGTGGAGAC 3' CTCTGTGACGGCCATTG	95/10, 56/10, 72/9	225
<i>P. micra</i> /ATCC 33270 Al-Hebshi et al. (2010)	5' TGAGCAACCTACCTTACACAG 3' GCCCTTCTTACACCGATAAATC	95/10, 56/10, 72/5	112
<i>F. nucleatum ssp.</i> /ATCC 10953 Miranda et al. (2014)	5' GCGCGTCTAGGTGGTTAT 3' GTAGTTCCGCTTACCTCTCCAG	95/10, 58/10, 72/4	105
<i>T. denticola</i> /ATCC 35405 Miranda et al. (2014)	5' GACGCAAACGCATTAAGTG 3' GCTACGCTGCCATATCT	95/10, 56/10, 72/7	174

ATCC: American Type Culture Collection

Table 2 - Demographic characteristics, glycemic parameters (mean  $\pm$  SD) and full-mouth and sampled site clinical parameters (mean  $\pm$  SD) of the study population.

Parameters	Groups				p-value
	Control	DM	S	SDM	
Gender (M %)	47.6 %	26.9 %	37.5 %	28.6 %	0.56 *
Age (years)	51.5 $\pm$ 8.4	56.7 $\pm$ 9.7	51.5 $\pm$ 8.1	55.2 $\pm$ 8.1	0.08 #
Years of smoking	-	-	24.9 $\pm$ 12.7	26.4 $\pm$ 12.5	0.69**
Cigarettes/day (n)			11.5 $\pm$ 1.5	16.3 $\pm$ 1.9	0.10**
Years of DM	-	7.0 $\pm$ 3.6	-	4.9 $\pm$ 1.3	0.24 **
HbA1c (%)	5.9 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	5.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	7.2 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	< 0.0001 ‡
Sites with plaque accumulation (%)	58.0 $\pm$ 20.6	69.5 $\pm$ 22.9	70.9 $\pm$ 17.4	62.3 $\pm$ 24.9	0.92 ‡
Sites with bleeding on probing (%)	42.0 $\pm$ 28.9	37.0 $\pm$ 22.5	34.6 $\pm$ 26.9	26.6 $\pm$ 17.7	0.99 ‡
Full-mouth PD (mm)	3.5 $\pm$ 0.8	3.7 $\pm$ 0.8	3.8 $\pm$ 1.1	3.5 $\pm$ 0.8	0.71 ‡
Full-mouth CAL (mm)	4.4 $\pm$ 1.1	4.9 $\pm$ 1.1	4.8 $\pm$ 1.4	4.7 $\pm$ 1.1	0.14 ‡
Healthy sampled site PD (mm)	2.3 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.4	0.46 ‡
Diseased sampled site PD (mm)	7.1 $\pm$ 1.9	7.2 $\pm$ 2.3	6.8 $\pm$ 1.8	6.7 $\pm$ 2.1	0.17 ‡
Healthy sampled site CAL (mm)	2.6 $\pm$ 1.2	2.9 $\pm$ 1.1	2.7 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 1.0	0.12 ‡
Diseased sampled site CAL (mm)	8.6 $\pm$ 2.4	8.7 $\pm$ 2.7	7.9 $\pm$ 2.3	8.0 $\pm$ 2.2	0.46 ‡

Different letters indicate differences among groups ( $p < 0.0001$ ) according to the following tests: \* Chi-square test; # ANOVA; ‡ Kruskal Wallis and Dunn tests; \*\* t-test.

PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; BoP: bleeding on probing; HbA1c: glycated hemoglobin; SD: standard deviation; DM: diabetes mellitus; S: smoking; SDM: smoking plus DM

Table 3 - Mean  $\pm$  SD (median) counts ( $\log^{10}$ ) of periodontal pathogens for all sites (healthy plus diseased sites).

Species	Groups				p-value
	Control	DM	S	SDM	
<i>T. denticola</i>	7.7 $\pm$ 1.3 (8.1)	6.5 $\pm$ 0.7 (6.5)	6.6 $\pm$ 1.0 (6.7)	6.2 $\pm$ 0.9 (6.2)	0.27
<i>P. gingivalis</i>	4.7 $\pm$ 1.4 (5.1)	4.4 $\pm$ 1.4 (4.8)	4.1 $\pm$ 1.9 (4.4)	3.7 $\pm$ 2.2 (4.4)	0.95
<i>T. forsythia</i>	5.3 $\pm$ 1.5 (5.3)	5.6 $\pm$ 1.1 (5.7)	5.4 $\pm$ 1.2 (5.4)	5.3 $\pm$ 0.8 (5.3)	0.38
<i>E. nodatum</i>	4.5 $\pm$ 1.0 (4.8)	4.3 $\pm$ 1.1 (4.4)	4.1 $\pm$ 1.3 (4.1)	4.2 $\pm$ 1.3 (4.7)	0.80
<i>P. micra</i>	4.4 $\pm$ 0.9 (4.6)	4.5 $\pm$ 0.8 (4.6)	4.4 $\pm$ 1.3 (4.6)	4.5 $\pm$ 1.0 (4.7)	0.57
<i>F. nucleatum ssp.</i>	5.2 $\pm$ 1.4 (5.3)	5.6 $\pm$ 0.6 (5.5)	5.1 $\pm$ 1.1 (5.3)	5.2 $\pm$ 0.9 (5.2)	0.39
<i>P. intermedia</i>	4.4 $\pm$ 1.0 (4.4)	3.7 $\pm$ 1.0 (3.6)	4.4 $\pm$ 1.1 (4.6)	4.1 $\pm$ 1.3 (4.2)	0.20

There were no differences among groups by mixed-model ANOVA, followed by post hoc analyses with the Bonferroni correction ( $p > 0.05$ ).

SD: standard deviation; DM: diabetes mellitus; S: smoking; SDM: smoking plus DM



Table 4 - Mean  $\pm$  SD (median) counts ( $\log^{10}$ ) of periodontal pathogens for healthy sites (sites with PD and CAL  $\leq$  3 mm with no BoP).

Species	Groups				p-value
	Control	DM	S	SDM	
<i>T. denticola</i>	7.5 $\pm$ 1.7 (7.2)	5.9 $\pm$ 1.6 (6.2)	6.3 $\pm$ 1.0 (6.3)	5.9 $\pm$ 1.0 (5.9)	0.43
<i>P. gingivalis</i>	2.8 $\pm$ 2.0 (2.8)	4.2 $\pm$ 1.8 (4.6)	3.2 $\pm$ 2.0 (3.1)	3.8 $\pm$ 2.1 (3.7)	0.44
<i>T. forsythia</i>	3.8 $\pm$ 1.2 (3.9)	4.9 $\pm$ 1.4 (5.2)	4.4 $\pm$ 1.2 (4.5)	4.6 $\pm$ 1.3 (4.7)	0.05
<i>E. nodatum</i>	3.3 $\pm$ 1.2 (3.1)	3.9 $\pm$ 1.2 (4.4)	3.5 $\pm$ 1.3 (3.8)	4.0 $\pm$ 1.4 (4.1)	0.16
<i>P. micra</i>	3.1 $\pm$ 1.2 (3.3) <sup>a</sup>	3.9 $\pm$ 1.0 (4.0)	4.1 $\pm$ 1.4 (4.3) <sup>b</sup>	4.3 $\pm$ 1.1 (4.4) <sup>b</sup>	0.03
<i>F. nucleatum ssp.</i>	4.4 $\pm$ 2.1 (4.2)	5.2 $\pm$ 0.9 (5.2)	4.5 $\pm$ 1.3 (4.7)	4.8 $\pm$ 1.2 (4.9)	0.56
<i>P. intermedia</i>	3.6 $\pm$ 0.9 (3.2)	3.5 $\pm$ 0.8 (3.5)	3.6 $\pm$ 0.9 (3.6)	3.8 $\pm$ 1.0 (3.6)	0.80

Different letters (a,b) indicate that groups are different by the mixed-model ANOVA, followed by post hoc analyses with the Bonferroni correction ( $p < 0.05$ ).

SD: standard deviation; DM: diabetes mellitus; S: smoking; SDM: smoking plus DM

Table 5 - Mean  $\pm$  SD (median) counts ( $\log^{10}$ ) of periodontal pathogens for diseased sites (PD and CAL  $\geq$  5 mm with BoP).

Species	Groups				p-value
	Control	DM	S	SDM	
<i>T. denticola</i>	7.8 $\pm$ 1.2 (8.1)	6.3 $\pm$ 1.5 (6.5)	6.8 $\pm$ 0.9 (6.9)	6.4 $\pm$ 0.9 (6.3)	0.41
<i>P. gingivalis</i>	4.6 $\pm$ 1.8 (4.3)	4.1 $\pm$ 1.6 (4.5)	4.5 $\pm$ 1.7 (4.6)	3.9 $\pm$ 2.2 (4.7)	0.99
<i>T. forsythia</i>	5.6 $\pm$ 1.5 (5.7)	5.7 $\pm$ 0.9 (5.9)	5.1 $\pm$ 1.4 (5.4)	5.4 $\pm$ 0.8 (5.3)	0.83
<i>E. nodatum</i>	4.8 $\pm$ 0.9 (5.0)	4.3 $\pm$ 1.3 (4.7)	4.3 $\pm$ 1.2 (4.7)	4.4 $\pm$ 1.1 (4.6)	0.98
<i>P. micra</i>	4.7 $\pm$ 0.9 (4.9)	4.4 $\pm$ 1.2 (4.8)	4.3 $\pm$ 1.5 (4.7)	4.4 $\pm$ 1.2 (4.4)	0.90
<i>F. nucleatum ssp.</i>	5.1 $\pm$ 1.2 (5.6)	5.6 $\pm$ 0.8 (5.6)	5.2 $\pm$ 1.2 (5.6)	5.2 $\pm$ 1.0 (5.5)	0.30*
<i>P. intermedia</i>	4.4 $\pm$ 1.2 (4.4)	3.8 $\pm$ 1.1 (2.9)	4.4 $\pm$ 1.3 (4.8)	4.2 $\pm$ 1.3 (4.2)	0.29
* Interaction between groups and the covariate gender.					
<i>F. nucleatum ssp.</i>					
Female	4.5 $\pm$ 1.4 (5.2) <sup>a</sup>	5.7 $\pm$ 0.9 (5.6) <sup>b</sup>	5.3 $\pm$ 1.2 (5.6)	5.3 $\pm$ 1.0 (5.6)	0.04
Male	5.7 $\pm$ 0.5 (5.7)	5.6 $\pm$ 0.6 (5.6)	5.1 $\pm$ 1.2 (5.5)	4.9 $\pm$ 1.3 (5.2)	0.21

Different letters indicate differences among groups according to mixed-model ANOVA, followed by post hoc analyses with the Bonferroni correction ( $p < 0.05$ ).

SD: standard deviation; DM: diabetes mellitus; S: smoking; SDM: smoking plus DM.

Table 6 - Percentages of healthy and diseased sites colonized by periodontal pathogens.

Species	Sites	Groups				p-value
		Control	DM	S	SDM	
<i>T. denticola</i>	Healthy	19	31	38	31	0.31
	Diseased	62	52	60	63	0.66
<i>P. gingivalis</i>	Healthy	33	38	43	36	0.69
	Diseased	52	52	56	59	0.92
<i>T. forsythia</i>	Healthy	38	42	50	52	0.51
	Diseased	76	67	80	80	0.40
<i>E. nodatum</i>	Healthy	43	50	55	50	0.74
	Diseased	76	62	76	76	0.29
<i>P. micra</i>	Healthy	45	50	56	60	0.52
	Diseased	81	69	87	80	0.19
<i>F. nucleatum ssp.</i>	Healthy	45	46	60	60	0.32
	Diseased	74	67	78	78	0.59
<i>P. intermedia</i>	Healthy	50	40	50	52	0.64
	Diseased	74	63	78	78	0.32

There were no differences among groups by Chi-square test ( $p > 0.05$ ).

DM: diabetes mellitus; S: smoking SDM: smoking plus DM.

#### 4. Conclusão

A colonização subgingival por *T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *E. nodatum*, *P. micra*, *F. nucleatum ssp.* e *P. intermedia* não foi significativamente diferente entre os portadores de periodontite crônica com DM e/ou hábito de fumar. Além disso, o DM e o tabagismo, conjunta e individualmente, não afetaram consideravelmente os níveis subgingivais de importantes patógenos periodontais em pacientes com periodontite crônica.

## Referências Bibliográficas

Aemaimanan P, Amimanan P, Taweechaisupapong S. Quantification of key periodontal pathogens in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with generalized chronic periodontitis. *Anaerobe*. 2013 Aug; 22: 64-8.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013 Jan; 36 Suppl 1: S67-74.

Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Impact of smoking on the clinical, microbiological and immunological parameters of adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Sep;32(9):973-83.

Bastos MF, Tucci MA, de Siqueira A, de Faveri M, Figueiredo LC, Vallim PC, Duarte PM. Diabetes may affect the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors more than smoking in chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2016 Jul 1. doi: 10.1111/jre.12394.

Bergström J, Eliasson S, Dock J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol*. 2000 Aug;71(8):1338-47.

Bergström J. Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2003 Feb;30(2):107-13.

Boström L, Bergström J, Dahlén G, Linder LE. Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2001 Mar;28(3):212-9.

Camelo-Castillo AJ, Mira A, Pico A, Nibali L, Henderson B, Donos N, Tomás I. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. *Front Microbiol*. 2015 Feb 24;6:119.

Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *J Periodontol*. 2005 Mar; 76 (3): 418-25.

Castrillon CA, Hincapie JP, Yepes FL, Roldan N, Moreno SM, Contreras A, Botero JE. Occurrence of red complex microorganisms and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with diabetes. *J Investig Clin Dent*. 2015 Feb;6(1):25-31.

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol*. 2000 Jun;27(6):417-24.

Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2008 Apr;79(4):637-46.

Eke PI, Wei L, Thornton-Evans GO, Borrell LN, Borgnakke WS, Dye B, Genco RJ. Risk Indicators for Periodontitis in US Adults: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol*. 2016 Oct;87(10):1174-85.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1991 Feb;62(2):123-31.

enhances bone loss in anterior teeth in a Brazilian population: a retrospective cross-sectional study. *Braz Oral Res*. 2008 Oct-Dec;22(4):328-33.

Field CA, Gidley MD, Preshaw PM, Jakubovics N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontal Res.* 2012 Aug;47(4):470-8.

Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, Marcantonio RA. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2006 Sep;77(9):1483-90.

GROSS, Jorge L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 2002, vol.46, n.1, pp.16-26.

Guglielmetti MR, Rosa EF, Lourenção DS, Inoue G, Gomes EF, De Micheli G, Mendes FM, Hirata RD, Hirata MH, Pannuti CM. Detection and quantification of periodontal pathogens in smokers and never-smokers with chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2014 Oct;85(10):1450-7.

Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2001 May;28(5):377-88.

Heikkinen AM, Pitkaniemi J, Kari K, Pajukanta R, Elonheimo O, Koskenvuo M, Meurman JH. Effect of teenage smoking on the prevalence of periodontal bacteria. *Clin Oral Investig.* 2012 Apr;16(2):571-80.

Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:196-209.

Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Jun;22(3):175-81.

Hong M, Kim HY, Seok H, Yeo CD, Kim YS, Song JY, Lee YB, Lee DH, Lee JI, Lee TK, Ahn HS, Ko YH, Jeong SC, Chae HS, Sohn TS. Prevalence and risk factors of periodontitis among adults with or without diabetes mellitus. *Korean J Intern Med.* 2016 Sep;31(5):910-9.

Jha P, Chaloupka FJ, Corrao M, Jacob B. Reducing the burden of smoking world-wide: effectiveness of interventions and their coverage. *Drug Alcohol Rev* 2006; 25: 597-609.

Katuri KK, Alluri JK, Chintagunta C, Tadiboina N, Borugadda R, Loya M, Marella Y, Bollepalli AC. Assessment of Periodontal Health Status in Smokers and Smokeless Tobacco Users: A Cross-Sectional Study. *J Clin Diagn Res.* 2016 Oct;10(10):ZC143-ZC146.

Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications.* 2006 Jan-Feb;20(1):59-68.

Khan S, Khalid T, Awan KH. Chronic periodontitis and smoking. Prevalence and dose-response relationship. *Saudi Med J.* 2016 Aug;37(8):889-94.

Kim EK, Lee SG, Choi YH, Won KC, Moon JS, Merchant AT, Lee HK. Association between diabetes-related factors and clinical periodontal parameters in type-2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health.* 2013 Nov 7;13:64.

- Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM Jr, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2016 Jun;71(1):22-51.
- Kubota M, Tanno-Nakanishi M, Yamada S, Okuda K, Ishihara K. Effect of smoking on subgingival microflora of patients with periodontitis in Japan. *BMC Oral Health*. 2011 Jan 5;11:1.
- Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res* 2012; 91: 142-149.
- Li C, Liu J, Tan L, Yu N, Lin L, Geng F, Zhang D, Pan Y. The sociodemographic characteristics, periodontal health status, and subgingival microbiota of patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: a case-control study in a Chinese population. *J Periodontol*. 2013 Aug; 84 (8): 1058-66.
- Lima FR, Cesar-Neto JB, Lima DR, Kerbauy WD, Nogueira-Filho GR. Smoking
- Linden GJ, Mullally BH. Cigarette smoking and periodontal destruction in Young adults. *J Periodontol*. 1994 Jul;65(7):718-23.
- Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*. 1986 May;13(5):431-45.
- Makiura N, Ojima M, Kou Y, Furuta N, Okahashi N, Shizukuishi S, Amano A. Relationship of *Porphyromonas gingivalis* with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):348-51.
- Meetoo D, McGovern P, Safadi R. An epidemiological overview of diabetes across the world. *Br J Nurs*. 2007 Sep 13-27;16(16):1002-7.
- Mohamed HG, Idris SB, Mustafa M, Ahmed MF, Åström AN, Mustafa K, Ibrahim SO. Influence of Type 2 Diabetes on Prevalence of Key Periodontal Pathogens, Salivary Matrix Metalloproteinases, and Bone Remodeling Markers in Sudanese Adults with and without Chronic Periodontitis. *Int J Dent*. 2016;2016:6296854.
- Natto S, Baljoon M, Bergström J. Tobacco smoking and periodontal health in a Saudi Arabian population. *J Periodontol*. 2005a Nov;76(11):1919-26.
- Natto S, Baljoon M, Dahlén G, Bergström J. Tobacco smoking and periodontal microflora in a Saudi Arabian population. *J Clin Periodontol*. 2005b Jun;32(6):549-55.
- Oliver RC, Tervonen T. Periodontitis and tooth loss: comparing diabetics with the general population. *J Am Dent Assoc*. 1993 Dec;124(12):71-6.
- Organização Mundial da Saúde. O diagnóstico, definição e classificação do Diabetes Mellitus e suas complicações. Parte 1: Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. WHO/NCD/NCS/99.2 ed. Genebra, 1999.
- Padmalatha GV, Bavle RM, Satyakiran GV, Paremala K, Sudhakara M, Makarla S. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* in chronic periodontitis patients associated with diabetes mellitus using real-time polymerase chain reaction. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2016 Sep-Dec;20(3):413-418.

Pindborg JJ. Tobacco and gingivitis; correlation between consumption of tobacco, ulceromembranous gingivitis and calculus. *J Dent Res.* 1949 Oct;28(5):460-3.

Sandberg GE, Sundberg HE, Fjellstrom CA, Wikblad KF. Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000 Sep;50(1):27-34.

Sardi JC, Duque C, Camargo GA, Hofling JF, Gonçalves RB. Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis--a pilot study. *Arch Oral Biol.* 2011 Oct;56(10):1098-105.

Seppää B, Ainamo J. Dark field microscopy of the subgingival microflora in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol.* 1996 Feb;23(2):63-7.

Seppälä B, Seppälä M, Ainamo J. A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1993 Mar;20(3):161-5.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb; 25 (2): 134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl.* 1994; (18): S684-5, 688-93.

Susin C, Haas AN, Valle PM, Oppermann RV, Albandar JM. Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in South Brazil. *J Clin Periodontol.* 2011 Apr;38(4):326-33.

Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8: 613-628.

Tanner AC, Maiden MF, Zambon JJ, Thoren GS, Kent RL Jr. Rapid chair-side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res.* 1998 Feb;33(2):105-17.

Thomson WM, Broadbent JM, Welch D, Beck JD, Poulton R. Cigarette smoking and periodontal disease among 32-year-olds: a prospective study of a representative birth cohort. *J Clin Periodontol.* 2007 Oct;34(10):828-34.

Torrunguang K, Tamsailom S, Rojanasomsith K, Sutdhibhisal S, Nisapakultorn K, Vanichjakvong O, Prapakamol S, Preamsirirund T, Pusiri T, Jaratkulangkoon O, Unkurapinun N, Sritara P. Risk indicators of periodontal disease in older Thai adults. *J Periodontol.* 2005 Apr;76(4):558- Khader 65.

Tsai YL, Tseng SF, Chang SH, Lin CC, Teng SC. Involvement of replicative polymerases, *Tell1p*, *Mec1p*, *Cdc13p*, and the Ku complex in telomere-telomere recombination. *Mol Cell Biol.* 2002 Aug;22(16):5679-87.

Tsourdi E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A, Bornstein SR. Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus. *Biomed Res Int.* 2013;2013:385641.

Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol.* 1998 Oct;69(10):1111-8.



van Winkelhoff AJ, Bosch-Tijhof CJ, Winkel EG, van der Reijden WA. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol*. 2001 May;72(5):666-71.

Vouros ID, Kalpidis CD, Chadjipantelis T, Konstantinidis AB. Cigarette smoking associated with advanced periodontal destruction in a Greek sample population of patients with periodontal disease. *J Int Acad Periodontol*. 2009 Oct;11(4):250-7.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.

World Health Organization. Global report on trends in prevalence of tobacco smoking. Media Centre. Updated June 2016.

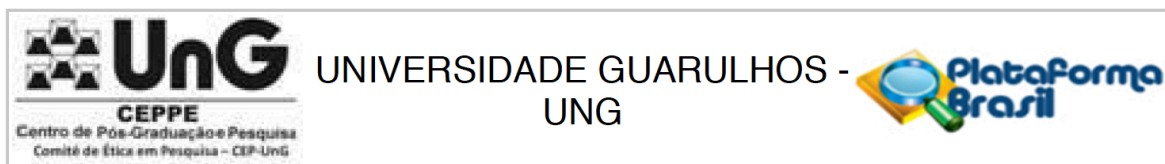
Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. *J Periodontal Res*. 2001 Feb;36(1):18-24.

Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG, Shlossman M, Dunford R, Genco RJ. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1988 Jan;59(1):23-31.

Zhou M, Rong R, Munro D, Zhu C, Gao X, Zhang Q, Dong Q. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One*. 2013 Apr 22; 8 (4): e61516.

## INFORMATIVO

Periodontite é uma doença infecciosa causada por múltiplas espécies de bactérias que geram inflamação ao redor dos dentes, resultando na destruição da gengiva e do osso, podendo levar à perda dental. Os sintomas dessa doença incluem sangramento, dentes moles, mau hálito, presença de tártaro (cálculo dental), entre outros. Os estudos científicos demonstram que indivíduos com diabetes melito e fumantes apresentam maior risco para desenvolvimento das periodontites bem como maior gravidade da doença. Logo, fumantes e diabéticos são atualmente considerados grupos de risco para periodontite. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do diabetes melito, do hábito de fumar e da associação de ambas as condições nos níveis de algumas bactérias presentes na placa que se adere aos dentes de pacientes com periodontite. De acordo com os resultados desse estudo, o diabetes melito e o hábito de fumar não afetaram consideravelmente os níveis dessas bactérias. Logo, sugere-se que a maior gravidade de periodontite observada em diabéticos e fumantes possa estar relacionada à menor capacidade de defesa desses indivíduos e não às diferenças nas quantidades e tipos de bactérias que estão ao redor de seus dentes.



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Influência dos fatores de risco para periodontite crônica no perfil imunoinflamatório, nos antagonistas da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e no perfil microbiológico subgengival

**Pesquisador:** Poliana Mendes Duarte

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 25526913.8.0000.5506

**Instituição Proponente:** Universidade Guarulhos - UNG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 518.426

**Data da Relatoria:** 28/01/2014

Continuação do Parecer: 518.426

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está apto a ser desenvolvido.

### Situação do Parecer:

Aprovado

### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

### Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisa pode ser iniciada. Esta aprovação é válida pelo período previsto no cronograma. Enviar relatório final, via Plataforma Brasil até 31 de janeiro de 2017.

GUARULHOS, 30 de Janeiro de 2014

---

**Assinador por:**  
**Jumara Sílvia Van De Velde**  
**(Coordenador)**

## INFORMATIVO

Periodontite é uma doença infecciosa causada por múltiplas espécies de bactérias que geram inflamação ao redor dos dentes, resultando na destruição da gengiva e do osso, podendo levar à perda dental. Os sintomas dessa doença incluem sangramento, dentes moles, mau hálito, presença de tártaro (cálculo dental), entre outros. Os estudos científicos demonstram que indivíduos com diabetes melito e fumantes apresentam maior risco para desenvolvimento das periodontites bem como maior gravidade da doença. Logo, fumantes e diabéticos são atualmente considerados grupos de risco para periodontite. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do diabetes melito, do hábito de fumar e da associação de ambas as condições nos níveis de algumas bactérias presentes na placa que se adere aos dentes de pacientes com periodontite. De acordo com os resultados desse estudo, o diabetes melito e o hábito de fumar não afetaram consideravelmente os níveis dessas bactérias. Logo, sugere-se que a maior gravidade de periodontite observada em diabéticos e fumantes possa estar relacionada à menor capacidade de defesa desses indivíduos e não às diferenças nas quantidades e tipos de bactérias que estão ao redor de seus dentes.