

BIOTRANS

**Programa de Pós - Graduação em
Biomedicina Translacional
Mestrado e Doutorado**



“Avaliação do perfil microbiano do biofilme subgengival e saúde periodontal em adultos jovens com sobrepeso e obesidade”

Danielle Rodrigues de Andrade

Orientadores: Prof^{fa}. Carina Maciel Silva Boghossian

Prof. Paulo André da Silva

Duque de Caxias

2017

Danielle Rodrigues de Andrade

**Avaliação do perfil microbiano do biofilme subgengival e saúde
periodontal em adultos jovens com com sobrepeso e
obesidade**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadores:

Prof^ª. Carina Maciel Silva Boghossian

Prof. Paulo André da Silva

Duque de Caxias

2017

- A553a Andrade, Danielle Rodrigues de.
"Avaliação do perfil microbiano do biofilme subgengival e saúde periodontal em adultos jovens com sobrepeso e obesidade" / Danielle Rodrigues de Andrade. - Duque de Caxias, 2017.
106 f. : il. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Ciências da Saúde, 2017.
"Orientadora: Profa. Carina Maciel Silva Boghossian".
"Coorientador: Prof. Paulo André da Silva".
Bibliografia: f. 79-94
1. Ciências Biomédicas. 2. Microbiota - Boca. 3. Saúde periodontal. 4. Obesidade. 5. Sobrepeso. I. Boghossian, Carina Maciel da Silva. II. Silva, Paulo André da. III. Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy". IV. Título.

CDD – 610

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



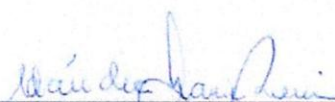
Às uma hora e trinta minutos do dia trinta de agosto do ano de 2017, Sala 209 do bloco A, Campus I da Universidade do Grande Rio, situado à Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160, Duque de Caxias, RJ realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação do perfil microbiano do biofilme subgengival e saúde periodontal em adultos jovens com sobrepeso e obesidade.", de autoria de **Danielle Rodrigues de Andrade**, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Biotrans, sob a orientação da Professora Dr.^a Carina Maciel da Silva Boghossian e Professor Dr. Paulo André da Silva. A sessão foi aberta pela Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Pereira, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof.^a Dr. Carina Maciel da Silva Boghossian (orientadora), Prof.^a Dr.^a Eidy de Oliveira Santos e Prof. Dr. Lucio Souza Gonçalves. Em seguida passou a palavra à candidata para apresentação de sua dissertação. Após apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores, e suas respostas consideradas satisfatórias.

O presidente declarou a mestranda **Danielle Rodrigues de Andrade**, APROVADA, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas em acordo com o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - Biotrans. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, onde foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

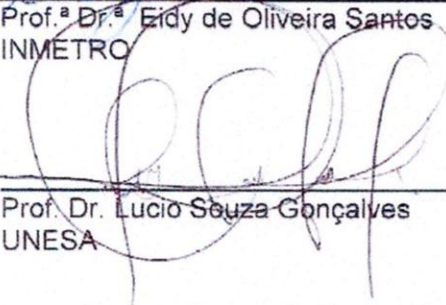
Duque de Caxias, 30 de agosto de 2017.


Prof.^a Dr.^a Carina Maciel da Silva Boghossian
UNIGRANRIO
Orientadora


Prof. Dr. Paulo André da Silva
UNIGRANRIO
Orientador


Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Pereira
UNIGRANRIO
Presidente


Prof.^a Dr.^a Eidy de Oliveira Santos
INMETRO


Prof. Dr. Lucio Souza Gonçalves
UNESA


Prof.^a Virginia Genelhu de Abreu
Coordenadora Geral do Programa
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional - BIOTRANS

A Deus, pelo dom da vida.

À minha família e amigos por estarem sempre ao meu lado.

A todos os que participaram de alguma forma em mais essa fase da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a sabedoria necessária para seguir sempre em frente.

Aos meus pais, Ricardo e Dinaleide, e irmãos, Alessandra e Gabriel que são o meu porto seguro e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões com tanto amor e carinho.

Ao meu noivo, Wallace, por todo amor, companheirismo, parceria, apoio e compreensão, mesmo nos momentos mais difíceis.

À professora Carina Boghossian, por todo apoio, orientação e ensinamentos transmitidos, especialmente pela confiança depositada em mim, o que me permitiu continuar.

Ao professor Paulo André pela colaboração, apoio e orientação.

À professora Ana Paula Colombo e a equipe do laboratório de Microbiologia Oral da UFRJ pela colaboração, apoio e acolhimento.

Aos professores do Programa de Pós-graduação Biotrans pelos ensinamentos transmitidos, pelos desafios propostos e pelo enriquecimento acadêmico e profissional que obtive ao longo desses dois anos.

Ao professor Plínio Senna pelos ensinamentos e revisão da dissertação.

À minha dupla Sarah Rodrigues, pelo apoio e desafios que enfrentamos.

Aos alunos de iniciação científica, Ana Carolina Leon Botelho, Edisa Oliveira de Souza, Gabriela Ranhada, Jacqueline Silveira da Silva, Luã Phelipy Cascado de Moares, Priscila Simões Autran, Tainá Fontes de Souza, que contribuíram diretamente com este trabalho, sempre muito solícitos e dispostos a ajudar.

À equipe do Laboratório de Genética da Unigranrio, especialmente à Danielle Voigt, Tamara Silva, Vivianne Galante, Raisa Martins, Ana Beatriz e Ritiele Bastos pela amizade construída, pelos ensinamentos e momentos de descontração.

Aos voluntários que participaram desse estudo.

Aos órgãos de fomento FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar
no sonho que se tem... quem acredita sempre alcança”.

Renato Russo

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a saúde periodontal e a composição do biofilme subgengival de adultos jovens com sobrepeso e obesidade. A população de estudo foi constituída por 85 alunos e/ ou funcionários da Unigranrio, Campus I. Foram incluídos indivíduos com idades entre 18 e 35 anos e com pelo menos 20 dentes, que tiveram suas medidas antropométricas registradas e, conforme o Índice de Massa Corporal (IMC), foram alocados em três grupos: Eutrófico (n = 34), Sobrepeso (n = 28) e Obeso (n = 23). Além disto, responderam a questionários anamnésicos, receberam exame periodontal completo e foram submetidos à coleta de biofilme dental subgengival. As amostras de biofilme subgengival foram coletadas e analisadas para 90 espécies microbianas através do método do *checkerboard DNA-DNA hybridization*. Diferenças significativas entre os grupos foram testadas pelos testes Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Qui-quadrado ao nível de significância de 5%. Gengivite foi diagnosticada em 69,6% dos participantes do grupo Obeso, em 55,6% do Sobrepeso e em 41,2% do Eutrófico. Quanto à periodontite, esta foi diagnosticada em 11,8% dos participantes do grupo Eutrófico, em 7,4% do Sobrepeso e em 4,3% do obeso. As espécies *Eikenella corrodens* e *Candida albicans* foram mais frequentemente encontradas em Eutrófico; enquanto *Dialister pneumosintes*, *Helicobacter pylori* e *Salmonella enterica* foram mais frequentemente detectadas em Sobrepeso e/ ou Obeso ($p < 0,05$). Os níveis das espécies *C. albicans*, *D. pneumosintes*, *Enterobacteria* spp., *Haemophilus influenzae*, *Olsenella uli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Porphyromonas gingivalis* foram significativamente maiores em Sobrepeso e/ ou Obeso comparado a Eutrófico ($p < 0,05$). Associações moderadas significativas foram encontradas entre o índice de sangramento gengival e as espécies bacterianas *E. corrodens* ($\rho = 0,535$; $p < 0,0001$), *Parvimonas micra* ($\rho = 0,483$; $p < 0,002$), *Treponema socranskii* ($\rho = 0,407$; $p < 0,0001$) e *H. influenzae* ($\rho = 0,418$; $p = 0,001$). Indivíduos com sobrepeso ou obesidade apresentam uma tendência a apresentarem quadro de gengivite mais frequentemente que eutróficos. Espécies bacterianas periodonto patogênicas, como *P. gingivalis*, e espécies extra-oriais, como *C. albicans* e *P. aeruginosa*, apresentam frequência e/ ou níveis significativamente mais elevados em sobrepeso e/ ou obesidade comparado a eutróficos. Existem associações moderadas significativas entre parâmetro indicativo de inflamação gengival e espécies bacterianas potencialmente patogênicas.

Palavras-chave: microbiota oral, saúde periodontal, doença periodontal, obesidade, sobrepeso, inflamação.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the periodontal health and the composition of the subgingival biofilm in young adults with overweight and obesity. The study population was composed by 85 students and/ or employees from Unigranrio, Campus I. Individuals with ages between 18 and 35 years-old, presenting at least 20 teeth were included, and were submitted to anamnestic questionnaires, complete periodontal evaluation, anthropometric measurements, and collection of subgingival biofilm. Then, they were categorized according to their Body Mass Index in Eutrophic (n = 34), Overweight (n = 28) and Obese (n = 23). Subgingival biofilm samples were analyzed for 90 bacterial species by checkerboard DNA-DNA hybridization technique. Significant differences were tested using Chi-square, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. The level of significance was 5%. Overall, 53.6% of studied individuals had gingivitis, which were diagnosed in 69.6% of Obese, in 55.6% of Overweight and in 41.2% of Eutrophic individuals. Regarding periodontitis, it was diagnosed in 11.8% of Eutrophic, in 7.4% of Overweight, and in 4.3% of Obese participants. The species *Eikenella corrodens* and *Candida albicans* were significantly more frequent in Eutrophic; while *Dialister pneumosintes*, *Helicobacter pylori*, and *Salmonella enterica* were more frequently detected in Overweight and/ or Obese ($p < 0.05$). Levels of the species *C. albicans*, *D. pneumosintes*, *Enterobacteria* spp., *Haemophilus influenzae*, *Olsenella uli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Porphyromonas gingivalis* were significantly higher in Overweight and/ or Obese compared to Eutrophic ($p < 0.05$). Moderate significant associations were found between gingival bleeding index and the species *E. corrodens* ($\rho = 0.535$; $p < 0.0001$), *Parvimonas micra* ($\rho = 0.483$; $p < 0.002$), *Treponema socranskii* ($\rho = 0.407$; $p < 0.0001$), and *H. influenzae* ($\rho = 0.418$; $p = 0.001$). Individuals with overweight or obesity present a tendency to have gingivitis more frequently than eutrophic individuals. Periodontopathic species, as *P. gingivalis*, and extra-oral species, as *C. albicans* and *P. aeruginosa*, present significantly higher frequency and/ or levels in overweight and/ or obesity compared to eutrophic. There are significant moderate associations between gingival inflammation parameter and putative pathogenic bacterial species.

Keywords: oral microbiota, oral health, periodontal disease, obesity, overweight, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das obesidades androide e ginecoide.....	22
Figura 2. Complexos microbianos do biofilme subgengival.....	36
Figura 3. Esquema do aparato “Minislot 30” e da preparação das amostras de placa dental	48
Figura 4. Esquema do aparato “Miniblotter 45” e da hibridização com as sondas de DNA	48
Figura 5. Fluxograma da amostra populacional do estudo	52
Figura 6. Diagnóstico periodontal para os grupos Eutrófico, Sobrepeso e Obeso	57
Figura 7. Diagnóstico periodontal para os grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso	58
Figura 8. Frequência das espécies bacterianas orais nos grupos Eutrófico, Sobrepeso e Obeso	60
Figura 9. Frequência das espécies microbianas extra-orais nos grupos Eutrófico, Sobrepeso e Obeso	61
Figura 10. Média dos níveis das espécies bacterianas orais nos grupos Eutrófico, Sobrepeso e Obeso	62
Figura 11. Média dos níveis das espécies microbianas extra-orais nos grupos Eutrófico, Sobrepeso e Obeso	63
Figura 12. Frequência das espécies bacterianas orais nos grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso	64

Figura 13. Frequência das espécies microbianas extra-orais nos grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso	65
Figura 14. Média dos níveis das espécies bacterianas orais nos grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso	67
Figura 15. Média dos níveis das espécies microbianas extra-orais nos grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do peso em adultos de acordo com o IMC	21
Tabela 2. Relação das cepas microbianas empregadas na confecção das sondas de DNA	49
Tabela 3. Dados demográficos da população de estudo de acordo com os grupos clínicos.....	53
Tabela 4. Dados antropométricos dos grupos estudados.....	54
Tabela 5. Médias ($\pm$ desvio-padrão) encontradas para os dados clínicos obtidos dos grupos estudados.....	56
Tabela 6. Análise de correlação entre índice de sangramento gengival (ISG) e espécies bacterianas estudadas.....	69
Tabela 7. Análise de correlação entre os níveis das espécies microbianas orais estudadas e os parâmetros antropométricos.....	70
Tabela 8. Análise de correlação entre os níveis das espécies microbianas extra-orais estudadas e os parâmetros antropométricos.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aa - Aggregatibacter actinomycetemcomitans

ATCC - do inglês *American Type Culture Collection*

BD - biofilme dental supragengival

CC - circunferência da Cintura

°C - Graus Celsius

DM2 – Diabetes Mellitus Tipo 2

DNA - do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

dp - Desvio-Padrão

EDTA - do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic acid*

GLM - do inglês *General Linear Models*

HOMINGS - do inglês *Human Oral Microbe Identification using Next Generation Sequencing*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBM - International Business Machines

IC - intervalo de confiança

IL - Interleucina

L - litro

IMC - Índice de Massa Corporal

ISG – Índice de Sangramento Gengival

μL - microlitro

μM - micromolar

μg - micrograma

mg - miligrama

min - minuto

mM - milimolar

mm - milímetro

mL - mililitro

M - molar

NCI - nível clínico de inserção

ng – nanograma

OB - obeso

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Proteína C-Reativa

pH - potencial hidrogeniônico

PNS - Pesquisa Nacional de Saúde

PS - profundidade de sondagem

QIIME - do inglês *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*

RCQ – razão cintura-quadril

RNA - do inglês *Ribonucleic Acid*

s - segundo (s)

SDS - do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*

SG - sangramento da margem gengival

SP - sobrepeso

SPSS - do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*

SS - sangramento à sondagem

SSC - do inglês *Saline-Sodium Citrate*

SU - supuração à sondagem

TE - Tampão tris-EDTA

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Obesidade.....	20
2.1.1 Tecido Adiposo	23
2.1.2 Moduladores Inflamatórios do Tecido Adiposo.....	25
2.2 Doença Periodontal	27
2.3 Obesidade e Doença Periodontal.....	30
2.4 Microbiota	32
2.4.1 Microbiota Intestinal	32
2.4.2 Espécies Orais	34
2.4.3 Espécies Extra-Orais	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Casuística	42
4.2 Dados anamnésicos	43
4.3 Avaliação clínica.....	43
4.3.1 Exame periodontal.....	43
4.3.2 Exame antropométrico.....	44
4.4 Determinação da microbiota subgengival	44
4.4.1 Coleta de biofilme subgengival.....	45
4.4.2 Preparo das membranas.....	45

4.4.3 Hibridização das membranas com as sondas de DNA	45
4.4.4 Detecção das espécies.....	46
4.5 Análise dos Dados	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Dados demográficos	52
5.2 Dados antropométricos	54
5.3 Dados periodontais	55
5.4 Diagnóstico periodontal	57
5.5 Análise Microbiológica	58
5.6 Análise de Correlação	69
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	95

1 Introdução

A obesidade é uma doença inflamatória crônica, de natureza multifatorial, caracterizada por um acúmulo excessivo de tecido adiposo que pode causar severos danos à saúde (WHO, 2000). Estima-se que aproximadamente 11% da população mundial esteja obesa, e que a incidência desta doença apresenta projeções alarmantes para as próximas décadas (WHO, 2015).

Embora a etiologia da obesidade seja multifatorial, esta doença possui um forte componente inflamatório, que ocorre em virtude da intensa secreção de citocinas, sintetizadas pelo tecido adiposo (GRUNDY *et al.*, 2004; ADAMCZAK e WIECEK, 2013). Estas moléculas conferem a este tecido importantes funções endócrina, metabólica, cardiovascular, além de atividade pró e anti-inflamatórias (NISOLI *et al.*, 2000; COPPACK, 2001; GRUNDY *et al.*, 2004; FOX *et al.*, 2007). Variações na expressão dessas adipocinas durante a obesidade podem resultar em distúrbios endócrinos e imunológicos (WEISBERG, *et al.*, 2003; GRUNDY *et al.*, 2004; ZEYDA *et al.*, 2007; BAYS, 2011; OUCHI *et al.*, 2011). Desta forma, a obesidade tem sido apontada como um indicador de risco para doenças infecciosas, como por exemplo, as doenças periodontais, que são doenças infecto-inflamatórias (GENCO *et al.*, 2005; NISHIDA *et al.*, 2005; THANAKUN e IZUMI, 2016).

As doenças periodontais possuem como fator etiológico primário a colonização do biofilme dental por microrganismos patogênicos (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992; HAFAJEE & SOCRANSKY, 1994). Variações da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro e fatores sistêmicos, que incluem doenças que modificam a resposta imune possuem íntima relação com a instalação e progressão das doenças periodontais (KORNMAN *et al.*, 1997). Neste sentido, muitos estudos apontam uma associação positiva entre IMC elevado, excesso de adiposidade abdominal e gravidade da doença periodontal (GENCO *et al.*, 2005; REEVES *et al.*, 2006; YLÖSTALO *et al.*, 2008; HAFAJEE e SOCRANSKY, 2009; SAXLIN *et al.*, 2011; MORITA *et al.*, 2011; SFASCIOTTI *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2016; KANGAS *et al.*, 2017).

Modificações na colonização microbiana oral estão relacionadas com a ocorrência de doença periodontal, ocorrendo diminuição de bactérias protetoras ou benéficas e um aumento nos níveis de patógenos periodontais (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2009; GOODSON *et al.*, 2009). Interessantemente, estudos demonstram que indivíduos obesos apresentam alterações na quantidade e diversidade microbiana oral e consequentemente, maior predisposição para o desenvolvimento de doença periodontal (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2009; GOODSON *et al.*, 2009; ZEIGLER *et al.*, 2012).

Além dos microrganismos residentes, é demonstrado que patógenos extra-orais de importância médica estão presentes no biofilme dental de indivíduos saudáveis e com periodontite (SOUTO e COLOMBO, 2008; PERSSON *et al.*, 2008; DA SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011; SOUTO *et al.*, 2014). Estes dados levantam a hipótese da participação destes microrganismos na patogênese da doença periodontal. Há ainda a possibilidade de que a cavidade oral atue como um importante reservatório de patógenos orais e extra-orais capazes de se disseminarem sistemicamente, o que poderia contribuir para o desencadeamento de quadros infecciosos em sítios distintos (COLOMBO *et al.*, 2016).

Até o momento, os mecanismos fisiopatológicos que medeiam a relação entre doença periodontal e obesidade não são conclusivos. É possível que a plausibilidade biológica, que demonstra uma conexão entre uma doença e outra ocorra em virtude dos eventos celulares e moleculares que ocorrem durante a obesidade, e que levam à modificação dos mecanismos imune-inflamatórios do indivíduo, modulando a resposta periodontal às bactérias. Portanto, frente às consequências associadas à obesidade e o seu impacto na saúde periodontal, o objetivo deste trabalho foi avaliar a saúde periodontal e a composição do biofilme subgengival de adultos jovens com sobrepeso e obesidade.

2 Revisão de Literatura

2.1 Obesidade

A ocorrência de obesidade resulta de uma complexa interação entre fatores genéticos, comportamentais, metabólicos, ambientais, culturais e socioeconômicos (WHO, 2000). Esta doença é caracterizada por um acúmulo excessivo de tecido adiposo que pode causar severos danos à saúde (WHO, 2015). Embora a natureza multifatorial da obesidade exerça um impacto importante para o desenvolvimento da doença, na maioria dos indivíduos, o excesso de peso está atribuído a sobrecarga calórica, em combinação com a inatividade física. Neste caso, o sedentarismo é um fator relevante para a crescente prevalência de sobrepeso e obesidade (OFFICE OF THE SURGEON GENERAL *et al.*, 2001; WHO, 2003).

Em conjunto com outras doenças crônicas metabólicas, como hipertensão arterial, diabetes tipo 2, dislipidemia, doenças cardiovasculares e renais, a obesidade representa atualmente uma grande ameaça para a saúde e qualidade de vida da população humana (WELLEN *et al.*, 2007; HALL *et al.*, 2015). Dados epidemiológicos demonstram sua ampla difusão em diferentes populações e que sua prevalência vem aumentando significativamente de forma a acometer grande parte da população mundial (ECKEL *et al.*, 2004; WHO, 2015).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstrou que a prevalência da obesidade duplicou entre 1980 e 2014. Dados epidemiológicos apontam que a prevalência mundial de obesidade entre mulheres e homens é de 15% e 11%, respectivamente (WHO, 2015). Na América Latina, estima-se que entre 42,4 e 51,8 milhões de jovens estejam com sobrepeso ou obesos.

No Brasil, segundo dados obtidos a partir da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS - 2013), a prevalência de sobrepeso na população brasileira atingiu um percentual de 56,9%, afetando mais da metade da população do país (IBGE, 2014). Entre os indivíduos obesos, que apresentaram IMC igual ou superior a 30 Kg/m², a prevalência de obesidade em mulheres adultas foi de 24,4%, superando o índice da população masculina com a mesma faixa etária, que apresentou percentual de 16,8%. Neste estudo, em complementaridade ao IMC, também

foram mensuradas as medidas de circunferência abdominal, identificando que a população feminina também apresenta maior prevalência de obesidade abdominal (52,1%) quando comparada à população masculina (21,8%) (PNS/IBGE, 2014).

O IMC é o método mais amplamente utilizado para classificar indivíduos adultos em relação à proporção peso corporal e altura. É calculado através da divisão do peso em quilogramas pela altura em metros ao quadrado (Kg/m^2). A classificação é feita de acordo com padrões internacionais (Tabela 1) que determinam que indivíduos adultos com IMC menor que $18,5 \text{ Kg/m}^2$ encontram-se abaixo do peso; IMC entre $18,5$ e $24,9 \text{ Kg/m}^2$ apresentam peso normal; IMC entre 25 e $29,9 \text{ Kg/m}^2$ são classificados com sobrepeso; e IMC igual ou acima de 30 Kg/m^2 encontram-se obesos (WHO, 2000; GODOY-MATOS *et al.*, 2009).

Tabela 1. Classificação do peso em adultos de acordo com o IMC (WHO, 2000).

Classificação	IMC (kg/m^2)	Risco de comorbidades
Baixo peso	$< 18,5$	Baixo
Peso normal	$18,5-24,9$	Mediano
Excesso de peso	≥ 25	
Pré-obesidade	$25,0$ a $29,9$	Aumentado
Obesidade grau I	$30,0$ a $34,9$	Moderado
Obesidade grau II	$35,0$ a $39,9$	Grave
Obesidade grau III	$\geq 40,0$	Muito grave

IMC: Índice de massa corporal

Embora o cálculo do IMC seja preconizado pela OMS para a classificação da obesidade em adultos, o método apresenta algumas limitações, uma vez que não avalia a heterogeneidade de deposição regional da gordura corporal (WHO, 2000). Diferentes formas de distribuição de gordura corporal estão associadas a maior risco de desenvolvimento de morbidades e mortalidade associados à obesidade (LLOYD-JONES *et al.*, 2009; XIA *et al.*, 2016). Isto é explicado pela

distribuição de acúmulo de gordura corporal, que determina diferentes e variáveis consequências e distúrbios metabólicos entre os indivíduos obesos (WHO, 2000).

Desta forma, outros indicadores antropométricos e de composição corporal, como, as medidas da circunferência da cintura (CC) e a razão entre as medidas das circunferências da cintura e do quadril (RCQ), podem ser utilizadas em complementaridade ao IMC. Essas medidas aferem a localização da gordura corporal, viabilizando a classificação da obesidade em androide, quando ocorre acúmulo de gordura ao redor do abdômen e na parte superior do corpo; ou ginecoide com armazenamento de gordura na parte inferior do corpo (WHO, 2000; GODOY-MATOS *et al.*, 2009). Os dois tipos de distribuição de gordura corporal estão representados na Figura 1.

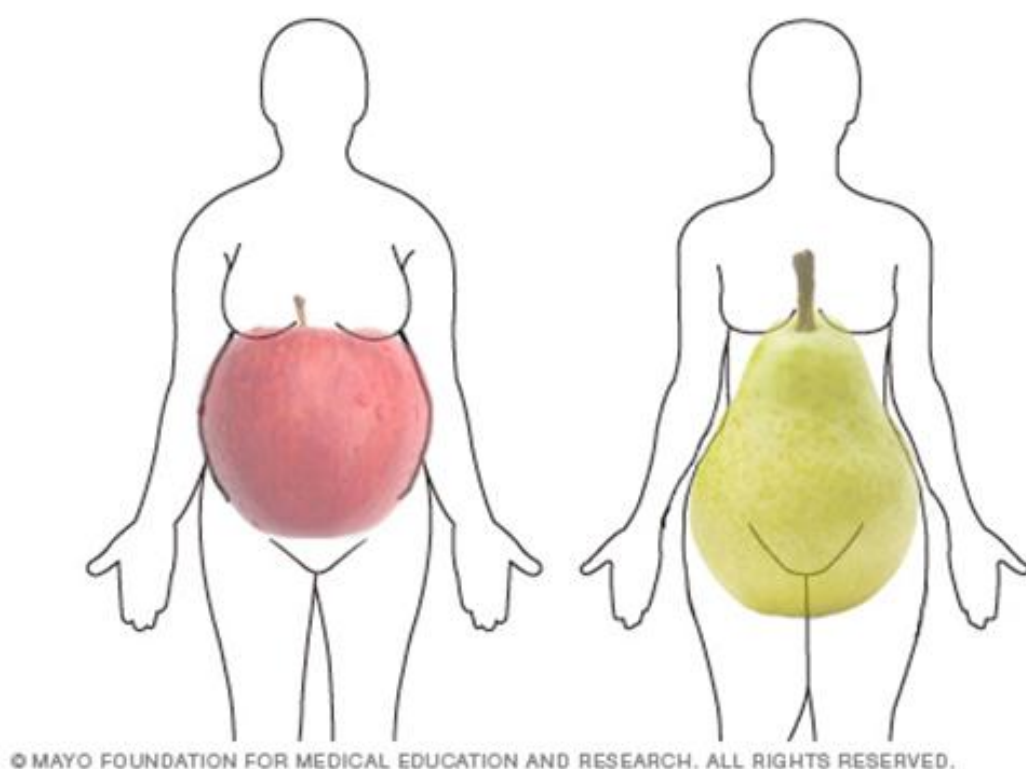


Figura 1. Representação esquemática dos tipos de distribuição de gordura corporal. Na distribuição androide (a) o indivíduo apresenta gordura localizada principalmente na região abdominal (“formato de maçã”) e ginecoide (b) o indivíduo apresenta gordura localizada principalmente na região do quadril (“formato de pêra”), retirado de: Mayo Foudation For Medical Education and Reserarch.

A medida da CC é um parâmetro simples e de fácil execução, frequentemente utilizado em estudos epidemiológicos com o objetivo de estimar a proporção de gordura abdominal e identificar o padrão de distribuição de gordura corporal em adultos. Os pontos de corte para essa variável antropométrica diferem de acordo com o sexo e a etnia. No Brasil, os pontos de corte correspondem ao padrão asiático, de 80 cm para mulheres e 94 cm para homens. A RCQ, por sua vez, segundo a OMS, apresenta pontos de corte de 0,90 e 0,85 para homens e mulheres, respectivamente (GODOY-MATOS *et al.*, 2009).

Na década de 1980, um estudo desenvolvido por Krotkiewski *et al.* (1983) avaliando a composição corporal de homens e mulheres, demonstrou que o acúmulo de gordura abdominal, avaliado através da medida da CC, estava diretamente relacionado à ocorrência de complicações metabólicas, como o aumento da pressão arterial, de triglicerídeos, de glicose e de insulina plasmáticos. Ainda neste estudo, em uma segunda análise, foi relatado que as complicações metabólicas associadas à obesidade estavam relacionadas ao aumento de tamanho de células adiposas. Além disto, o estudo mostrou diferença no padrão de distribuição de gordura corporal entre homens e mulheres (KROTKIEWSKI *et al.*, 1983). Desde então, estudos demonstram que o acúmulo de adiposidade abdominal é um preditor crítico para o desenvolvimento de doenças metabólicas e vasculares (WHO, 2003; FOX *et al.*, 2007; XIA *et al.*, 2016).

2.1.1 Tecido adiposo

O tecido adiposo abdominal é o maior depósito de gordura corporal. Seus compartimentos de gordura são divididos em tecido adiposo visceral e subcutâneo, que diferem entre si de acordo com aspectos estruturais, funcionais, de vascularização, de inervação e de atividade lipolítica (TCHERNOF e DESPRÉS, 2013). O tecido adiposo visceral compreende aproximadamente 10 a 20% do total de gordura em homens e 5 a 8% em mulheres (KAMINSKI e RANDALL, 2010). Este tecido é encontrado na região intra-abdominal, localizada em torno das vísceras e no peritônio, na borda dorsal do intestino e na superfície

ventral do rim (DESPRÉS, 2006). O tecido adiposo subcutâneo, por sua vez, representa aproximadamente 80% da massa de gordura total em indivíduos saudáveis. Embora este represente o maior depósito do tecido adiposo humano, o tecido adiposo visceral é metabolicamente mais ativo, e o seu acúmulo está intimamente relacionado à morbimortalidade associada à obesidade (GIRARD e LAFONTAN, 2008).

O tecido adiposo é constituído por diversos tipos celulares, como, por exemplo, adipócitos maduros, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos e células do sistema imune (Lee *et al.*, 2010). Os adipócitos são células predominantes neste tecido, e possuem como principal função o armazenamento de gordura como reserva energética, sob a forma de triglicerídeos (CARNEIRO e JUNQUEIRA, 2012). Entretanto, a partir de investigações clínicas realizadas nas últimas duas décadas, o tecido adiposo passou a ser reconhecido como um órgão endócrino, por ser uma importante fonte de moléculas bioativas, que podem ter efeito local ou sistêmico (GRUNDY *et al.*, 2004; ADAMCZAK e WIECEK, 2013), podendo atuar como importantes moduladores inflamatórios (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995).

Alterações anatômicas, funcionais e na quantidade dos adipócitos, são influenciadas pelo aumento de adiposidade e podem acarretar em perda funcional destas células, desencadeando o aumento do recrutamento de células da resposta imune e, conseqüentemente, aumento da síntese e secreção de mediadores inflamatórios sistemicamente (WEISBERG *et al.*, 2003; GRUNDY *et al.*, 2004; BAYS, 2011). Esse evento é condizente com estudos que demonstraram intensa infiltração de macrófagos em tecido adiposo metabolicamente disfuncional. Curiosamente, estas células são descritas como a principal fonte secretora de mediadores inflamatórios no tecido adiposo (WEISBERG *et al.*, 2003; ZEYDA *et al.*, 2007).

Desta forma, a obesidade é classificada como um estado inflamatório crônico de baixo grau (OUCHI *et al.*, 2011). Neste estado, ocorre intensa secreção de adipocitocinas sintetizadas principalmente pelo tecido adiposo visceral, e em menor quantidade pelo tecido adiposo subcutâneo (FOX *et al.*,

2007). A atividade secretora do tecido adiposo é intensa, produzindo uma variedade de hormônios, fatores de crescimento e citocinas, como interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e os fatores de complemento B, C3 e D (adipsina) (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995; BASTARD *et al.*, 2000; NISOLI *et al.*, 2000; COPPACK, 2001; GRUNDY *et al.*, 2004).

2.1.2 Moduladores inflamatórios do tecido adiposo

O TNF- α é uma molécula pró-inflamatória sintetizada principalmente por monócitos e macrófagos e exerce um papel central nas doenças inflamatórias e autoimunes (OUCHI *et al.*, 2011). Níveis de TNF- α aumentados são geralmente encontrados no tecido adiposo de indivíduos obesos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995) e podem regular negativamente a produção de adiponectina (FANTUZZI, 2005) e induzir a produção de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR) (RITCHIE, 2007). O aumento da expressão de RNAm de TNF- α no tecido adiposo foi correlacionado positivamente com hiperinsulinemia em indivíduos obesos. Interessantemente, a diminuição do peso corporal implicou no aumento da sensibilidade à insulina e redução na expressão de RNAm de TNF- α nestes indivíduos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995).

Interleucina 6 (IL-6) por sua vez, é uma citocina pleiotrópica que exerce diversos efeitos biológicos na regulação imunológica, inflamação, hematopoiese e oncogênese (KISHIMOTO, 2010). Dentre estas atividades, IL-6 tem sido descrita como uma citocina pró-inflamatória envolvida na resistência à insulina associada a obesidade (OUCHI *et al.*, 2011). Além disto, apresenta uma correlação positiva com o ganho ponderal (FRIED *et al.*, 1998) e tem sua expressão reduzida paralelamente a perda de gordura corporal (ESPOSITO *et al.*, 2003).

A adiponectina é uma das citocinas mais abundantes secretada pelos adipócitos (MAEDA *et al.*, 1996). É um hormônio que auxilia no metabolismo de lipídios e glicose, e possui importante atividade anti-inflamatória e sensibilizante à insulina (COTTAM *et al.*, 2004; BERG e SCHERER, 2005). Essas propriedades concedem a essa molécula inúmeros efeitos benéficos sobre complicações metabólicas associadas a obesidade, dislipidemia e vários tipos de câncer

(WANG *et al.*, 2008). É possível que a adiponectina possua capacidade de suprimir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, contribuir na reversão da disfunção metabólica (OUCHI *et al.*, 2011). Por outro lado, esse hormônio tem sua produção reduzida em obesos e, conseqüentemente, há uma resposta imuno-inflamatória alterada nestes indivíduos, tornando-os mais vulneráveis a infecções (CNOP *et al.*, 2003; BERG e SCHERER, 2005; RITCHIE, 2007).

Outro hormônio derivado do tecido adiposo é a leptina, um polipeptídeo secretado pelos adipócitos e que atua na regulação da homeostase energética (ZHANG *et al.*, 1994; FRIEDMAN e HALAAS, 1998). A leptina age sobre o sistema nervoso central através de mecanismos que envolvem a ativação de centros hipotalâmicos, que, por sua vez, são responsáveis pelo equilíbrio entre a ingestão alimentar e o dispêndio energético (CAMPFIELD *et al.*, 1995). Essa regulação ocorre por meio da supressão do apetite e aumento do gasto energético, e conseqüentemente tem sido implicada na perda de peso corporal (HALAAS *et al.*, 1995). As concentrações plasmáticas de leptina são proporcionais a massa de gordura corporal, portanto indivíduos obesos apresentam níveis elevados de leptina circulante. No entanto, estes indivíduos não apresentam as respostas anoréxicas esperadas (FRIEDMAN e HALAAS, 1998). Estudos reportam que o aumento dos níveis plasmáticos de leptina em indivíduos obesos resulta no desenvolvimento de resistência à ação da leptina, o que nestes indivíduos pode favorecer o ganho ponderal. Em modelos experimentais, deficiência na síntese de leptina ou a ineficiência de seus receptores implicaram em obesidade mórbida, devido ao aumento da ingestão alimentar e diminuição do gasto energético (ZHANG *et al.*, 1994). Em humanos, além do ganho ponderal, leptinemia congênita foi associada ao desenvolvimento de diversas desordens endócrinas, metabólicas, de reprodução e imunológicas, que foram reversíveis após a administração de leptina (FAROOQI *et al.*, 2002).

Embora algumas citocinas secretadas pelo tecido adiposo atuem de maneira parácrina ou autócrina, outras moléculas inflamatórias são liberadas na circulação sanguínea, atuando como moléculas de sinalização para outros órgãos e tecidos, contribuindo para o estabelecimento do quadro inflamatório

sistêmico (YUDKIN, 2003; GRUNDY *et al.*, 2004). Assim, a expressão desregulada dessas adipocinas, causadas pelo excesso de adiposidade e pela disfunção do adipócito na obesidade, tem sido relacionada à patogênese de diversas doenças por meio de respostas imunes alteradas (Ouchi *et al.* 2011). Nesta vertente, além dos distúrbios metabólicos associados ao excesso de peso, evidências apontam uma associação positiva entre obesidade e maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças infecciosas, como, por exemplo, a doença periodontal (AL-ZAHRANI *et al.*, 2003; GENCO *et al.*, 2005; NISHIDA *et al.*, 2005; YLÖSTALO *et al.*, 2008; THANAKUN e IZUMI, 2016).

2.2 Doença periodontal

As doenças periodontais são processos infecto-inflamatórios de natureza multifatorial, que possuem como etiologia a presença de complexos microbianos patogênicos aderidos às superfícies não descamativas da cavidade oral (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992; HAFAJEE & SOCRANSKY, 1994). Estes microrganismos interagem com os tecidos e células do hospedeiro, desencadeando a liberação de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios, que estão relacionados com a destruição progressiva do ligamento periodontal, do osso alveolar e com a formação de bolsas periodontais (CARRANZA, 2007).

A gengivite é a doença periodontal mais prevalente. Quando induzida pela placa bacteriana é resultado de um desequilíbrio das interações bactéria-hospedeiro, que, em decorrência de fatores locais, sistêmicos, medicamentosos e nutricionais, podem modular a diversidade microbiana do biofilme dental, desencadeando um processo inflamatório (ARMITAGE, 1999; CARRANZA, 2007). Apesar de não levar à perda de inserção ou reabsorção óssea, os sinais clínicos da gengivite incluem eritema e edema do tecido gengival, presença de placa bacteriana e sangramento gengival (AAP, 1999).

A periodontite, por sua vez, é uma forma de doença periodontal destrutiva, que acomete indivíduos susceptíveis (ARMITAGE, 1999). Diferencia-se da gengivite pelas evidências clínicas de perda de inserção e radiográficas de perda de osso alveolar (CARRANZA, 2007; LINDHE, 2011). Trata-se de uma doença

infecto-inflamatória crônica, amplamente observada na população mundial, e conhecida como uma das principais causas de perda dentária em adultos nas diferentes populações (PIHLSTROM *et al.*, 2005; PETERSEN e OGAWA, 2012).

Dados epidemiológicos estimam que aproximadamente 10 a 15% da população mundial adulta apresenta doença periodontal avançada, com presença de bolsas periodontais profundas (PETERSEN e OGAWA, 2012). Essas evidências são influenciadas por fatores de risco biológicos, ambientais, comportamentais, demográficos e socioeconômicos como, higiene bucal precária, ocorrência de doenças sistêmicas, idade, tabagismo, estresse, baixo nível de escolaridade e socioeconômico (PETERSEN e OGAWA, 2012; HAAS *et al.*, 2014; HAAS *et al.*, 2015). O impacto destes fatores na saúde periodontal justifica a heterogeneidade epidemiológica da periodontite entre diferentes populações (ECKE *et al.*, 2015). Além disto, diferentes estratégias metodológicas para o diagnóstico da doença periodontal também podem explicar discrepâncias nas estimativas de prevalência da periodontite (COSTA *et al.*, 2009).

No Brasil, dados do último levantamento epidemiológico da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (SB Brasil 2010), demonstraram que a presença de bolsas periodontais na população brasileira é bastante expressiva em todos os grupos etários, aumentando com a idade. Este índice foi encontrado em aproximadamente 9,7% dos adolescentes com idade entre 15 e 19 anos, 19,4% no grupo etário de 35 a 44 anos e 3,3%, apenas, no grupo de 65 a 74 anos. Um dado relevante deste estudo demonstra um alto índice de extrações dentárias ao longo da vida destes indivíduos, atingindo aproximadamente 90% dos indivíduos idosos. Esses dados justificam o decréscimo na presença de bolsas periodontais neste grupo etário (BRASIL, 2011).

Um estudo realizado em uma amostra representativa de adolescentes e adultos jovens, com idade entre 14 e 29 anos, da população de Porto Alegre, demonstrou elevada prevalência de periodontite crônica nesta população (SUSIN *et al.*, 2011). Neste estudo, a ocorrência da doença foi associada a idade, status socioeconômico, tabagismo e presença de cálculo dentário.

Haas e colaboradores (2014), ao acompanhar uma coorte ao longo de 5 anos demonstraram que indivíduos com baixo nível de escolaridade apresentaram um risco 53% maior de progressão da doença do que indivíduos com alto nível de escolaridade. Adicionalmente, os autores observaram uma interação significativa entre gênero e tabagismo, ao avaliar que entre indivíduos fumantes, mulheres apresentam maior risco de progressão da doença do que homens (HAAS *et al.*, 2014). Estudos longitudinais em amostras populacionais brasileiras ainda são escassos, no entanto, muito necessários para identificar fatores de risco associados à progressão e gravidade das doenças periodontais.

As doenças periodontais destrutivas podem apresentar diferentes formas clínicas. Além dos fatores de risco já conhecidos, estima-se que a extensão e a gravidade da periodontite estão associadas a variações da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro e fatores sistêmicos, que incluem doenças que modificam a resposta imune (KORNMAN *et al.*, 1997). Proteinases, citocinas e prostaglandinas são os principais mediadores pró-inflamatórios secretados pelas células de defesa do hospedeiro para eliminar o estímulo microbiano (CARRANZA, 2007). No entanto, estudos demonstram que TNF- α , IL-1 e IL-6 atuam como importantes reguladores do processo de reabsorção óssea e degradação do tecido conjuntivo (PAGE, 1991; MCLEAN, 2009). Portanto, em respostas hiper-imunes, estas moléculas exercem um papel importante na destruição dos tecidos periodontais e, conseqüentemente, podem induzir a progressão da doença (PAGE, 1991; PAGE e KORNMAN, 1997; KAJIYA *et al.*, 2010). Além disto, o contato íntimo de algumas espécies bacterianas com o tecido epitelial, permite que patógenos periodontais possam penetrar no tecido gengival (COLOMBO *et al.*, 2007), e através de disseminação hematogênica de origem periodontal, levar a processos infecciosos com repercussão sistêmica (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Esta condição inflamatória sistêmica pode corroborar com evidências científicas que associam a periodontite a distúrbios metabólicos e vasculares (OLIVEIRA *et al.*, 2010; KUDO *et al.*, 2015; SZULC *et al.*, 2015; ARDILA *et al.*, 2015).

2.3 Obesidade e doença periodontal

Diversas hipóteses foram formuladas com o objetivo de avaliar a associação entre a obesidade e a doença periodontal. Essas abordagens incluem tolerância à glicose, perfil lipídico anormal, deficiência do sistema imunológico, aumento da ativação de macrófagos, alterações da microcirculação e secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo (DALLA VECCHIA *et al.*, 2005; D'AIUTO *et al.*, 2008; YLÖSTALO *et al.*, 2008; BENGUIGUI *et al.*, 2010; SCORZETTI *et al.*, 2013; JARAMILLO *et al.*, 2016; THANAKUN e IZUMI, 2016).

Com base nessas evidências, o estado pró-inflamatório provocado pela obesidade, em decorrência do aumento da expressão de adipocitocinas sistemicamente, tem sido apontado como um importante indicador de risco para doenças periodontais, podendo induzir a instalação e a progressão da periodontite (GENCO *et al.*, 2005; NISHIDA *et al.*, 2005; THANAKUN e IZUMI, 2016). Os resultados obtidos a partir de estudos que avaliam o impacto negativo da obesidade na saúde gengival, sugerem que a plausibilidade biológica entre uma doença e outra resulta da combinação de perfis metabólicos e inflamatórios. Além disto, a prática de maus comportamentos de saúde bucal e deficiência de medidas preventivas às doenças da cavidade oral também impactam na piora da saúde periodontal (SFASCIOTTI *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2016).

Estudos em diferentes populações têm demonstrado associação positiva entre sobrepeso e obesidade, classificadas através do IMC e profundidade de sondagem aumentada ou gravidade da doença periodontal (GENCO *et al.*, 2005; YLÖSTALO *et al.*, 2008; HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2009; SAXLIN *et al.*, 2011; MORITA *et al.*, 2011; SFASCIOTTI *et al.*, 2016). Da mesma forma que ocorre em outras doenças crônicas, o excesso de adiposidade abdominal, tendo início nas primeiras fases da vida, também exerce um impacto negativo na saúde gengival, e está associada com a formação de bolsas periodontais e periodontite (REEVES *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2016; KANGAS *et al.*, 2017). Curiosamente, indivíduos com IMC < 18,5 kg/m², podem apresentar redução na suscetibilidade à doença periodontal (AL-ZAHRANI *et al.*, 2003). Al-Zahrani e colaboradores

demonstraram que, em indivíduos adultos jovens, um IMC elevado pode estar associado positivamente com a prevalência de doença periodontal. Resultados similares foram demonstrados em um estudo de meta-análise, ao avaliar crianças e adolescentes que demonstraram que a obesidade calculada através do IMC está intimamente relacionada com índice de placa dental, sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e taxa de fluxo de secreção salivar (LI *et al.*, 2015). Nesta mesma vertente, uma amostra representativa de escolares brasileiros demonstrou associação positiva entre alterações da condição periodontal e estado nutricional (CAVALCANTI *et al.*, 2016).

Há indicações de que indivíduos com sobrepeso ou obesos podem apresentar níveis aumentados de mediadores inflamatórios circulantes, como PCR e leptina, com redução de adiponectina na presença de periodontite avançada (THANAKUN e IZUMI, 2016). Os autores também observaram que indivíduos com sobrepeso ou obesos apresentavam periodontite mais destrutiva, quando comparados a indivíduos eutróficos. Níveis elevados de PCR circulante também foram encontrados em pacientes com grande perda de inserção gengival e bolsa periodontal (YOSHII *et al.*, 2009). Como descrito, em indivíduos com sobrepeso ou obesidade, a produção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo agrava a condição inflamatória sistêmica predisponente ao estabelecimento ou piora de doenças inflamatórias, como a periodontite (CAVALCANTI *et al.*, 2016).

Evolutivamente, seres humanos e microrganismos compartilham um relacionamento simbiótico ou mutualista, no qual a microbiota residente proporciona importantes benefícios para o hospedeiro, incluindo imunização, regulação de respostas pró-inflamatórias excessivas, regulação de sistemas gastrointestinais e cardiovasculares e prevenção da colonização por microrganismos exógenos. Por outro lado, desequilíbrios na composição microbiana têm sido associados a uma série de desordens clínicas, como a obesidade, e doenças inflamatórias, como a periodontite (MARSH, 2015). Todavia, estes desequilíbrios podem ser influenciados por fatores endógenos ou exógenos ao hospedeiro (PENDERS *et al.*, 2006).

2.4 Microbiota

2.4.1 Microbiota intestinal

A microbiota humana é constituída por aproximadamente 100 trilhões de microrganismos que estabelecem uma relação simbiótica com o hospedeiro humano (SAVAGE, 1977; ROSEMBAUM *et al.*, 2015). A maior parte destes microrganismos residem no intestino (MILLION *et al.*, 2013b), onde conferem importante proteção ao hospedeiro contra a colonização por espécies patogênicas, participam efetivamente da modulação da resposta imunológica, na produção de vitaminas do complexo B e K e na extração de energia de polissacarídeos provenientes da dieta (TANNOCK, 2001; PENNA E NICOLI, 2001; LEY *et al.*, 2005; HOOPER, 2009; TADDEI *et al.*, 2011; ROSENBAUM *et al.*, 2015). Portanto, a microbiota intestinal desempenha importantes funções imunológica, antibacteriana e metabólica (DE MORAES *et al.*, 2014).

Existe uma grande variabilidade da microbiota intestinal entre indivíduos, incluindo diferenças nas proporções relativas aos filos dominantes, de gêneros e espécies microbianas (NICHOLSON *et al.*, 2012; DE MORAES *et al.*, 2014). Embora na idade adulta a microbiota intestinal seja relativamente estável, alterações na colonização podem ocorrer por fatores internos ou externos ao hospedeiro, como, por exemplo, alimentação, uso de antibióticos, fatores genéticos, ocorrência de doenças, estresse, entre outros (PENDERS *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2015).

Neste contexto, tem sido demonstrado que a quantidade e tipo de nutrientes ingeridos na dieta constituem fatores que interferem na composição microbiana intestinal, e exercem um impacto significativo na modulação metabólica e balanço energético (LEY *et al.*, 2005; DE MORAES *et al.*, 2014). Consequentemente, diversos estudos apontam a participação de bactérias intestinais no desenvolvimento de obesidade e outros distúrbios metabólicos (BÄCKHED *et al.*, 2004; DUNCAN *et al.*, 2008; DELZENNE *et al.*, 2011; JUMPERTZ *et al.*, 2011; ZANG *et al.*, 2015).

Os dois filos mais abundantes na microbiota intestinal em humanos e em camundongos são os Firmicutes e os Bacteroidetes (MILLION *et al.*, 2013). Entretanto, ao investigar modelos experimentais de obesidade, Ley e colaboradores (2005) observaram que há um aumento na proporção de espécies do filo Firmicutes e menor proporção de Bacteroidetes em camundongos obesos (LEY *et al.*, 2005). Além disto, foi demonstrado que uma dieta hiperlipídica pode favorecer a diminuição da diversidade microbiana intestinal e um aumento na proporção de espécies do filo Firmicutes (LEY *et al.*, 2005; HILDEBRANDT *et al.*, 2009; DE FILIPPO *et al.*, 2010). Corroborando estes dados, camundongos *germ-free*, submetidos à transplante de microbiota intestinal humana e a uma dieta com alto teor lipídico, apresentaram rápida modificação da composição microbiana intestinal com o aumento significativo da adiposidade corporal (TURNBAUGH *et al.*, 2009).

Em uma outra vertente, demonstrou-se que há uma contribuição para o estado inflamatório sistêmico induzido por produtos bacterianos, como por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram-negativas (CANI *et al.*, 2007). O LPS se liga a receptores do tipo *toll like*, presentes na membrana plasmática de diversos tipos celulares, incluindo células imunológicas e adipócitos, e a partir de então desencadeiam a ativação de vias de sinalização inflamatórias (LE SAGE *et al.*, 2017). Quadros de endotoxemia metabólica, que ocorre devido ao aumento de LPS plasmático, são influenciados por dieta hiperlipídica (CANI *et al.*, 2007) e atuam como importantes ativadores de cascatas de sinalização inflamatória. Estes eventos resultam em diminuição da síntese de mediadores anti-inflamatórios, como adiponectina, e aumento de moléculas pró-inflamatórias, como TNF-alfa, leptina, IL-6, entre outros (LE SAGE *et al.*, 2017), que medeiam a inflamação crônica. Esta precede eventos como resistência à insulina, diabetes tipo 2 e obesidade, que são doenças que compartilham uma importante influência imunológica (OUCHI *et al.*, 2011).

Já está bem estabelecido na literatura, uma associação entre obesidade, distúrbios metabólicos e microbiota intestinal (LEY *et al.*, 2005; TURNBAUGH *et al.*, 2009; MILLION *et al.*, 2013). Entretanto, a microbiota oral também tem sido

amplamente associada a estes eventos, principalmente por apresentar uma vasta comunidade microbiana, que pode estar relacionada com saúde, doença, inflamação e quadros clínicos com repercussão sistêmica (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2009; GOODSON *et al.*, 2009; ZEIGLER *et al.*, 2012).

2.4.2 Espécies orais

A cavidade oral é um ecossistema complexo, constituído por aproximadamente 700 espécies bacterianas, que subsistem em equilíbrio dinâmico (PASTER *et al.*, 2006). No entanto, a colonização do biofilme dental por microrganismos potencialmente patogênicos está relacionada com o desenvolvimento de doença periodontal (SOCRANSKY, 1998; HOLT e EBERSOLE, 2005).

Os biofilmes em geral, são constituídos por comunidades microbianas altamente complexas, organizadas e funcionais, banhadas por uma matriz polimérica, que se aderem a superfícies rígidas e/ou não descamativas (DUPONT, 1997; COSTERTON *et al.*, 1999). O biofilme dental, por sua vez, é composto por uma vasta diversidade de espécies microbianas, que podem estar aderidas à margem gengival, no interior do sulco gengival ou da bolsa periodontal (DUPONT, 1997). Embora a formação deste biofilme apresente algumas propriedades benéficas ao hospedeiro, como impedir a colonização por espécies oportunistas, este elemento abriga espécies bacterianas responsáveis pelo desenvolvimento e progressão de algumas doenças orais, como as doenças cárie e periodontal (COSTERTON *et al.*, 1999; HOLT e EBERSOLE, 2005).

Inicialmente, a colonização da cavidade oral ocorre predominantemente por microrganismos gram-positivos, aeróbios facultativos (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005). Estas espécies apresentam as propriedades necessárias para se aderirem às superfícies, tais como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces oris*, *Actinomyces naeslundii* e, em menor quantidade, algumas espécies de *Prevotella* spp. e *Fusobacterium* spp., que estabelecem uma relação comensal com o hospedeiro (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005). Espécies de

Streptococcus spp. e *Veillonella* spp. geralmente estão presentes em muitos sítios da cavidade oral, no entanto, a maioria das bactérias possuem sítios específicos de colonização (PASTER *et al.*, 2006).

À medida que ocorre transição do meio aeróbio para um meio privado de oxigênio, e o biofilme se torna mais estável e maduro, o meio torna-se viável para a colonização por espécies gram-negativas, como *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, espécies de *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, entre outras, que se aderem aos colonizadores primários da placa bacteriana (RITZ, 1967; SOCRANSKY *et al.*, 1998; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005)

A partir da análise de perfis microbianos de múltiplas amostras de biofilme subgingival, Socransky e colaboradores (1998) identificaram que a formação da placa dental ocorre de forma sucessiva, existindo uma hierarquia e interação entre as comunidades microbianas que constituem o biofilme (SOCRANSKY *et al.*, 1998), corroborando dados relatados em estudos anteriores (RITZ, 1967; SOCRANSKY *et al.*, 1977; ZEE *et al.*, 1996). Com base nessas evidências, essas comunidades foram grupadas em complexos bacterianos (Figura 2), que obedecem uma ordem de colonização e está associado com a disponibilidade de oxigênio, da fonte de nutrientes e da interação entre as espécies bacterianas. Os complexos foram classificados nos grupos verde, roxo, amarelo, laranja e vermelho (SOCRANSKY *et al.*, 1998), e posteriormente, o complexo azul, constituído por espécies de *Actinomyces* foi incluído pelos autores (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002). Desde então, tem sido demonstrado que a doença periodontal está fortemente associada aos complexos que surgem mais tardiamente no biofilme subgingival e não a um agente patogênico específico. Observou-se que os complexos laranja e vermelho possuíam estreita relação entre si e estavam mais associados com a ocorrência de doença periodontal, enquanto que os demais complexos estavam inter-relacionados e eram predominantes na saúde periodontal (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Entretanto, embora exista uma grande diversidade de espécies bacterianas presentes no biofilme subgingival, somente três espécies são reconhecidas como patógenos periodontais clássicos, que são *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,

Tannerella forsythia e *P. gingivalis* (SLOTS e TING, 1999; HOLT e EBERSOLE, 2005; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005).

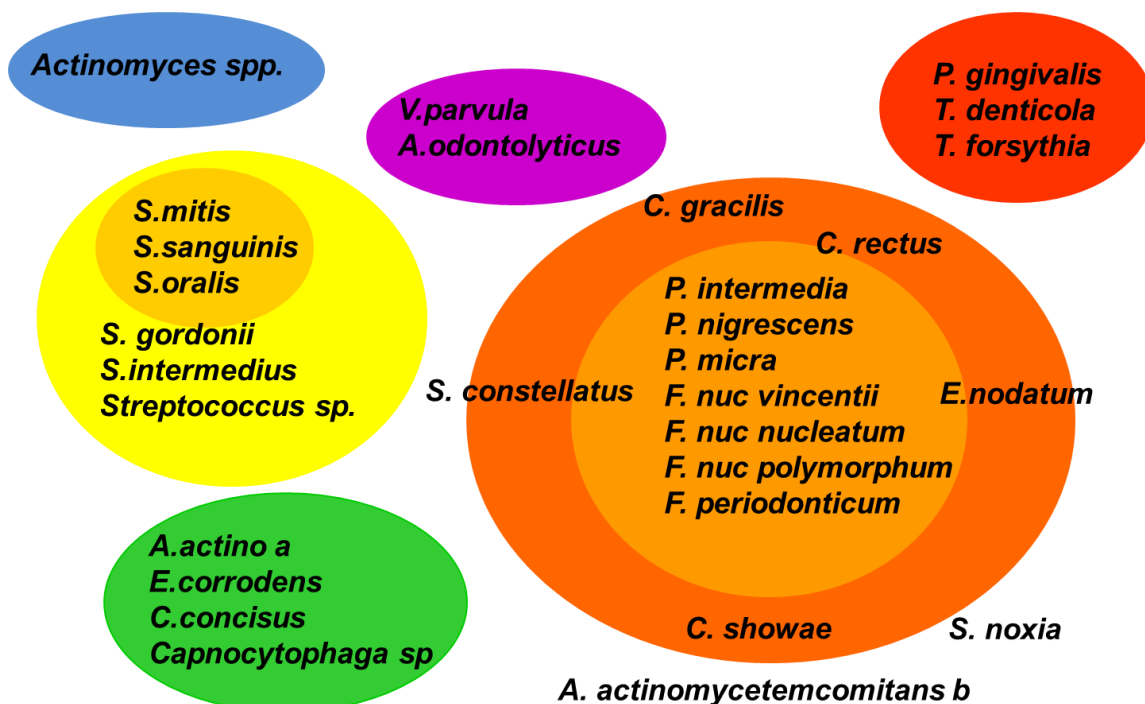


Figura 2. Complexos microbianos do biofilme subgengival, adaptado de Socransky e Haffajee (2002).

A doença periodontal tem etiologia bacteriana, sendo a presença dos patógenos essencial, mas não suficiente para a ocorrência da doença. Desta forma, a suscetibilidade individual do hospedeiro e a presença de bactérias capazes de facilitar a colonização por patógenos periodontais oportunistas são necessários para o início e a progressão do processo inflamatório (HAFFAJEE *et al.*, 1998). Além disto, é necessário que os patógenos periodontais estejam presentes em proporções significativamente elevadas (LINDHE, 2011).

Modificações na colonização microbiana oral estão relacionadas com a ocorrência de doença periodontal, ocorrendo diminuição de bactérias protetoras ou benéficas e aumento nos níveis de patógenos periodontais (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2009; GOODSON *et al.*, 2009). É provável que a presença de bactérias comensais induzam uma resposta imune protetora, enquanto que, bactérias que constituem o complexo vermelho, utilizam diversos mecanismos para interferir nos mecanismos de defesa do hospedeiro (DARVEAU, 2010).

P. gingivalis, por exemplo, que é um periodonto-patógeno chave implicado na periodontite crônica (SOCRASKY *et al.*, 1998), apresenta cápsula e fímbrias, que são respectivamente, estruturas capazes de inibirem a fagocitose e facilitarem sua aderência e penetração ao tecido (NJOROGGE *et al.*, 1997; CARRANZA, 2007; YOSHIMURA *et al.*, 2009). Além da capacidade de aderência e de invasão de células eucarióticas, a sobrevivência de microrganismos está associada a mecanismos evolutivos que sobrepujam as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro (FLANNAGAN *et al.*, 2009). Gingipaínas secretadas por *P. gingivalis* são capazes de degradar colágeno (HOULE *et al.*, 2003) e, portanto, enriquecer o microambiente subgingival favorecendo o crescimento de outras espécies bacterianas do complexo vermelho (SOCHALSKA *et al.*, 2017). Além disto, é possível que em baixas concentrações, as gingipaínas de *P. gingivalis* ativem o complemento e desta forma, também favoreçam a nutrição e conseqüentemente o crescimento bacteriano. Por outro lado, em concentrações elevadas, essas proteases possuem potente ação degradante de múltiplos componentes do complemento (POPADIAK *et al.*, 2007). Produtos bacterianos secretados por outros patógenos periodontais também são importantes ferramentas de neutralização das respostas imunes (NJOROGGE *et al.*, 1997). *P. intermedia* produz uma série de proteases degradantes de imunoglobulinas, enquanto *A. actinomycetemcomitans* produz duas importantes leucotoxinas capazes de degradar linfócitos T e B e prejudicam a resposta de neutrófilos às bactérias, através da inibição de IL-8 por células epiteliais (CARRANZA, 2007). *T. forsythia*, por sua vez, apresenta propriedade citotóxica que pode levar a apoptose de linfócitos (CARRANZA, 2007), e fatores de coagregação para outras bactérias orais e de resistência sorológica (SHIMOTAHIRA *et al.*, 2013). Adicionalmente, outros produtos bacterianos produzidos por estes e outros patógenos, são capazes de degradar tecidos do hospedeiro diretamente (HOULE *et al.*, 2003), ou, como o LPS, atuam como importantes indutores da resposta inflamatória (LE SAGE *et al.*, 2017).

Avanços recentes no campo da pesquisa periodontal sustentam a hipótese de que a periodontite tem início a partir de uma microbiota sinérgica e

disbiótica (HAJISHENGALLIS e LAMONT., 2012; DENG *et al.*, 2017). Em contraste, essas evidências são consistentes de que “agentes patogênicos chave” atuam na modulação da resposta imunológica, orquestrando os eventos celulares e moleculares que levam a distúrbios da homeostase e consequentemente, ao quadro de disbiose que precede a doença (DARVEAU, 2010; HAJISHENGALLIS e LAMONT., 2016). Ao longo do tempo, estudos reportaram diferenças significativas na composição microbiana nos estados de saúde e doença (SLOTS, 1977; SOCRANSKY, 1977; TANNER *et al.*, 1979; MOORE *et al.*, 1982). Desde então, buscou-se avaliar a influência de condições patológicas sistêmicas na modulação das microbiotas, como, por exemplo, a microbiota oral.

Neste sentido, foi demonstrado que em adolescentes obesos, a microbiota que constitui o biofilme subgengival apresentou aproximadamente três vezes maior quantidade de células bacterianas pertencentes a cinco filos distintos, quando comparados a adolescentes eutróficos (ZEIGLER *et al.*, 2012). Os autores também observaram um aumento substancial das espécies *Campylobacter rectus* e *Neisseria mucosa* em indivíduos obesos.

Em um outro estudo, foi demonstrado que existe uma associação positiva entre IMC elevado e maior susceptibilidade para o desenvolvimento de periodontite (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2009). Além disto, foi encontrado que indivíduos que eram jovens e ao mesmo tempo obesos apresentavam até quatro vezes maior predisposição para o desenvolvimento de periodontite quando comparado a jovens eutróficos (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2009). Além disto, os autores identificaram diferenças na composição do biofilme subgengival entre indivíduos eutróficos e obesos, destacando-se uma associação positiva entre o número de células de *T. forsythia* e o IMC. No estudo de Goodson *et al.* (2009), foi observado que a composição microbiana da saliva de mulheres com excesso de peso apresentou elevada quantidade da espécie *Selenomonas noxia*, diferindo consideravelmente de indivíduos eutróficos e saudáveis. Com os resultados obtidos a partir deste estudo, os autores sugeriram que a composição microbiana pode indicar um processo de adiposidade em curso e que a

microbiota oral pode estar diretamente relacionada com o desenvolvimento da obesidade.

2.4.3 Espécies extra-orais

A cavidade bucal consiste num ambiente dinâmico, composto por uma microbiota abundante e heterogênea (PASTER *et al.*, 2006; PERSSON *et al.*, 2008). Além dos microrganismos residentes, tem sido demonstrada a presença de patógenos extra-orais de significância clínica, colonizando o biofilme dental de indivíduos saudáveis e com periodontite (SOUTO e COLOMBO, 2008; PERSSON *et al.*, 2008; DA SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011; SOUTO *et al.*, 2014). As propriedades biológicas de cada *habitat* determinam a colonização microbiana (MARSH, 2015). No entanto, tem sido demonstrado que microrganismos extra-orais possuem capacidade de se associarem a patógenos orais, possivelmente, com papel importante na patogênese da doença periodontal (SOUTO e COLOMBO, 2008). Embora patógenos extra-orais sejam detectados em amostras de biofilme subgengival de indivíduos saudáveis, níveis significativamente mais elevados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. foram observados em indivíduos com periodontite crônica (DA SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011; SOUTO *et al.*, 2014). Estas espécies bacterianas são frequentemente associadas a infecções respiratórias graves, principalmente as que apresentam tendência a se tornarem crônicas (CHASTRE e FAGON, 2002; WAGNER e IGLEWSKI, 2008).

Um estudo realizado por Colombo e colaboradores (2016), que avaliou a prevalência e os níveis de espécies não orais presentes no biofilme subgengival, demonstrou que espécies de enterobactérias, *Candida albicans*, *Neisseria* spp., e *P. aeruginosa* são encontradas em níveis elevados na microbiota periodontal e estão associados à inflamação e destruição tecidual. Em contraste, outras espécies não orais foram associadas à saúde periodontal (COLOMBO *et al.*, 2016). Contudo, estes estudos apontam a periodontite como um fator predisponente à colonização do biofilme dental por patógenos extra-orais (SOUTO e COLOMBO, 2008; DA SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011; SOUTO *et al.*, 2014).

Embora seja crescente o número de investigações que demonstram a presença de espécies extra-orais de importância médica na cavidade oral, ainda não está claro o papel destes microrganismos na saúde ou doença, e se estas espécies apresentam propriedades de colonização ou ocorrem de forma transitória na cavidade oral. Todavia, as evidências relatadas na literatura, enfatizam a importância da cavidade oral como um reservatório de patógenos orais e extra-orais capazes de se disseminarem sistemicamente e desencadearem quadros infecciosos em sítios distintos (COLOMBO *et al.*, 2016).

Quadros de disbiose têm sido apontados como eventos causais de diversos processos infecciosos, incluindo a periodontite (HAJISHENGALLIS e LAMONT., 2012; DENG *et al.*, 2017). No entanto, deve-se enfatizar a natureza multifatorial da doença periodontal, uma vez que desequilíbrios da interação bactéria-hospedeiro são influenciados por fatores intrínsecos ou extrínsecos ao mesmo. Neste contexto, a microbiota tem sido relatada como um componente chave para a ocorrência da obesidade e outros distúrbios metabólicos (MATSUSHITA *et al.*, 2015)

Muitos aspectos que medeiam a relação periodontite-obesidade permanecem inconclusivos, pois a ordem temporal de desenvolvimento das duas patologias permanece obscura, visto que, não há evidências suficientes que demonstrem que a obesidade pode favorecer a progressão da doença periodontal e vice-versa (CHAFFEE e WESTON, 2010). No entanto, é possível que exista uma associação bidirecional entre doença periodontal e obesidade (LI *et al.*, 2015), sobretudo pela transição de uma microbiota comensal para uma microbiota patogênica. Além disto, esta associação pode ser respaldada pelos mecanismos patogênicos e inflamatórios da doença periodontal, que podem atuar sistemicamente, tanto pela invasão bacteriana dos tecidos periodontais (COLOMBO *et al.*, 2007), quanto pela liberação crônica de citocinas pró-inflamatórias (KUDO *et al.*, 2015). Estes fenômenos podem acarretar em efeitos recíprocos entre estas duas doenças (THANAKUN e IZUMI, 2016).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a saúde periodontal e a composição do biofilme subgengival de adultos jovens com sobrepeso e obesidade.

3.2 Objetivos específicos

- Definir o quadro de saúde periodontal da população estudada em indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos;
- Determinar a frequência de detecção e os níveis de espécies microbianas presentes no biofilme subgengival;
- Investigar associações entre as espécies microbianas estudadas e parâmetros relacionados a sobrepeso e obesidade.

4. Material e Métodos

4.1 Casuística

A casuística foi obtida a partir de uma amostra de conveniência constituída por indivíduos com sobrepeso, obesidade e eutróficos. A população do estudo foi selecionada ao longo de 12 meses consecutivos, entre estudantes e funcionários da Unigranrio, *Campus I*, que aceitaram o convite de participação voluntária, respeitando-se os critérios de inclusão e exclusão. Os indivíduos selecionados foram informados sobre os detalhes do projeto e concordaram com a avaliação clínica, antropométrica e molecular. Todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em anexo). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unigranrio, sob número 1.500.927 (em anexo).

Critérios de inclusão:

Os indivíduos deveriam ter idade 18 e 35 anos, $IMC \geq 18,5 \text{ kg/m}^2$ e $\leq 24,9 \text{ kg/m}^2$ para o Grupo Eutrófico; $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $\leq 29,9 \text{ kg/m}^2$ para o Grupo Sobrepeso; e $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ para o Grupo Obeso, além de possuir pelo menos 20 dentes.

Critérios de exclusão:

Os indivíduos que apresentavam as condições clínicas a seguir foram excluídos do estudo: intolerância à glicose ou DM2, hipertensão arterial, hepatopatia, nefropatia, endocrinopatias, neoplasias e doenças cardiovascular, autoimune, hematológica, psiquiátrica e inflamatória intestinal. Outros critérios de exclusão compreenderam: gestação e lactação, tabagismo, uso de fármacos que interferem com o peso corporal, metabolismo de carboidratos e lipídios e hipotensores. Uso de substâncias ilícitas. Necessitar de quimioprofilaxia para o atendimento odontológico ou ter feito uso de antimicrobianos nos últimos seis meses. Ou ter recebido tratamento periodontal no último ano. Além disto, alunos do curso de odontologia não foram incluídos.

4.2 Dados anamnésicos

Foram registrados em questionário anamnésico o gênero, o nível de escolaridade, a ocupação, a raça, a renda familiar, dados de saúde geral e odontológica (em anexo).

4.3 Avaliação Clínica

4.3.1 Exame periodontal

Os exames periodontais incluíram registros dicotomizados da presença de biofilme dental supragengival (BD), Sangramento gengival (SG); sangramento à sondagem (SS) e/ ou supuração à sondagem (SU) e mensuração da profundidade de sondagem (PS) e do nível clínico de inserção (NCI) em mm. O exame clínico foi iniciado pelo registro de presença de BD, que é realizado através da visualização das superfícies dentárias após secas com jato de ar em campo sob isolamento relativo. Em seguida foi realizada a sondagem periodontal em seis sítios por elemento dentário com sonda periodontal milimetrada da Carolina do Norte (Hu-Friedy; Chicago). Os sítios a seguir foram examinados: ângulo disto-vestibular, face vestibular, ângulo méso-vestibular, ângulo méso-palatino ou méso-lingual, face palatina ou lingual e ângulo disto-palatino ou disto-lingual. Durante a sondagem periodontal foram registrados a PS e o NCI simultaneamente. Os terceiros molares foram excluídos da avaliação clínica. Os exames periodontais foram realizados por 2 examinadores treinados e calibrados. O coeficiente de correlação intra-classe para NCI ao nível do sítio variou entre 0,91 e 0,96, e entre 0,90 e 0,95 para PS.

Os critérios utilizados para determinação do diagnóstico periodontal foram descritos previamente por (DA SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011). Assim, o diagnóstico clínico do perfil periodontal foi estabelecido baseado nos seguintes critérios: saúde periodontal, $\leq 10\%$ dos sítios com SS, sem PS ou NCI $> 3\text{mm}$, embora PS ou NCI = 4 mm em até 5% dos sítios sem SS fosse permitido; gengivite, $> 10\%$ dos sítios com SS, sem PS ou NCI $> 3\text{mm}$, embora PS ou NCI = 4mm em até 5% dos sítios sem SS fosse permitido; e periodontite (crônica), $> 10\%$ dos dentes com PS e/ou NCI $\geq 5\text{mm}$ e SS.

4.3.2 Exame antropométrico

Índice de Massa Corporal (IMC): Os indivíduos foram pesados e medidos em uma mesma balança com estadiômetro (balança antropométrica mecânica, Mod. 104A – Balmak). Esta balança é capaz de mensurar até 300 Kg e seu estadiômetro possui régua antropométrica retrátil, medindo até 2,00 m com graduação de 0,5 cm. Portanto, o peso foi registrado em quilogramas e a altura em cm. Para a realização destas avaliações, o participante deveria estar trajando roupas leves, estar descalço, sem acessórios ou bolsas e com os bolsos vazios. Ao subir na balança, o indivíduo foi orientado a distribuir o peso em ambos os pés e olhar para a linha do horizonte. O IMC foi calculado dividindo-se o peso (em kg) pela altura ao quadrado (em m²).

Circunferência da cintura (CC) e do quadril (CQ): foram mensuradas com fita métrica metálica, graduada em centímetros, com o paciente em pé. A CC e a CQ foram medidas, respectivamente, no ponto médio entre a crista ilíaca e o último arco costal e na maior circunferência posterior das nádegas. A RCQ foi obtida com a divisão da CC pela CQ.

4.4 Determinação da Microbiota Subgengival através do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*

O *Checkerboard DNA-DNA hybridization* é um método molecular, desenvolvido por Socransky e colaboradores (SOCRANSKY et al., 1998) que permite a detecção e semi-quantificação de múltiplas amostras e espécies microbianas, simultaneamente, a partir da hibridização com sondas genômicas de DNA. É um método de fácil execução, realizado em três etapas: fixação das amostras de biofilme subgengival nas membranas; hibridização com as sondas de DNA; e detecção das espécies microbianas através do escaneamento das

membranas e captação das imagens. Todas as etapas estão descritas detalhadamente abaixo.

4.4.1 Coleta de biofilme subgengival

Amostras de biofilme subgengival foram coletadas de todas as faces dos primeiros molares permanentes de cada indivíduo. Caso o indivíduo não possuísse algum desses molares, o segundo molar permanente foi utilizado ou, ainda, na ausência desses, foram utilizados os segundos pré-molares. Desta forma, foram obtidas quatro amostras por indivíduo.

4.4.2 Preparo das Membranas

O método para identificação dos microrganismos no biofilme subgengival foi realizado através da técnica descrita por Socransky e colaboradores (1994), com modificações (COLOMBO *et al.*, 2005; HELLER *et al.*, 2011).

As suspensões de biofilme em TE com NaOH foram fervidas em banho-maria por 10 min e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 mL de 5 M de acetato de amônia. Cada suspensão contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “Minislot 30” (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e o DNA concentrado numa membrana de náilon (15 X 15 cm) carregada positivamente (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, SP, Brasil). A membrana foi removida do aparato e o DNA depositado na membrana fixado através da exposição à temperatura de 120°C por 20 min em forno (Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil). As duas últimas canaletas do “Minislot” foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies de micro-organismos investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas (Figura 3).

4.4.3 Hibridização das Membranas com as Sondas de DNA

Após fixação do DNA nas membranas, estas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1h numa solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína, 5 x SSC, 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “Miniblotter 45” (Immunetics) com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às canaletas

do “Miniblotter 45”. Em cada canaleta foram colocadas 135 μ L de cada sonda específica diluída em solução de hibridização, contendo 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 ng/mL de sonda da DNA específica. O aparato foi incubado a 42°C por no mínimo 16h para hibridização (Figura 4). As sondas genômicas para as espécies bacterianas foram confeccionadas usando o *Random Primer Digoxigenin Labeling Kit* (Roche Applied Science, São Paulo, SP, Brasil) (Tabela 2).

4.4.4 Detecção das Espécies

Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do “Miniblotter 45” e lavadas por 5 min em temperatura ambiente, seguidos de duas lavagens de 20 min a 68°C em solução adstringente (0,1 X SSC, 0,1% SDS), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas em solução bloqueadora (0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20 e 0,5% de caseína, pH 8,0) por 1h, e incubadas por 30 min na mesma solução bloqueadora contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche Applied Science) numa diluição de 1/25.000. As membranas foram lavadas em solução tampão (0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0) duas vezes por 15 min e uma vez por 5 min em uma solução contendo 0,2 M de Dietanolamina (pH 9,5) e 2 mM de $MgCl_2$. Em seguida, uma solução detectora de fluorescência (AttoPhos® AP Fluorescent Substrate System, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) foi adicionada às membranas. Finalmente, as membranas foram escaneadas e as imagens captadas pelo Sistema de Imagens Storm TM 860 (Molecular Dynamics, GE Healthcare Life Sciences), utilizando-se o *software* ImageQuant versão 5.2 (GE Healthcare Life Sciences). Os sinais emitidos foram avaliados visualmente por comparação com os controles de 10^5 e 10^6 células bacterianas para as espécies testes na mesma membrana. Os sinais foram registrados como: 0: não detectado; 1: $<10^5$ células; 2: $\sim 10^5$ células; 3: 10^5 - 10^6 células; 4: $\sim 10^6$ células; 5: $>10^6$ células. A sensibilidade da técnica desse teste é ajustada para permitir a detecção a partir de 10^4 células de uma determinada espécie, através do ajuste de cada sonda de DNA. Este

procedimento é realizado com o objetivo de se obter a mesma sensibilidade de detecção para cada espécie. A ausência de detecção é computada como zero, no entanto níveis entre 1-1000 podem estar presente.

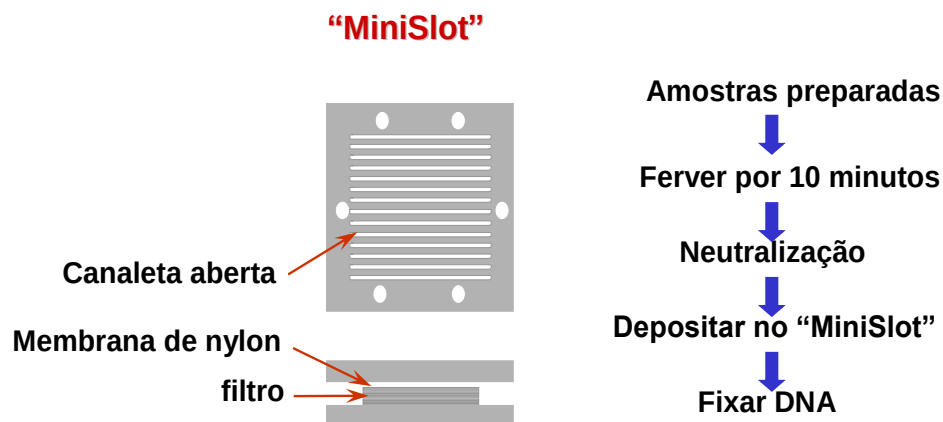


Figura 3. Esquema do aparato “Minislot 30” (Immuntetics, Cambridge, MA, EUA) e da preparação das amostras de placa dental.

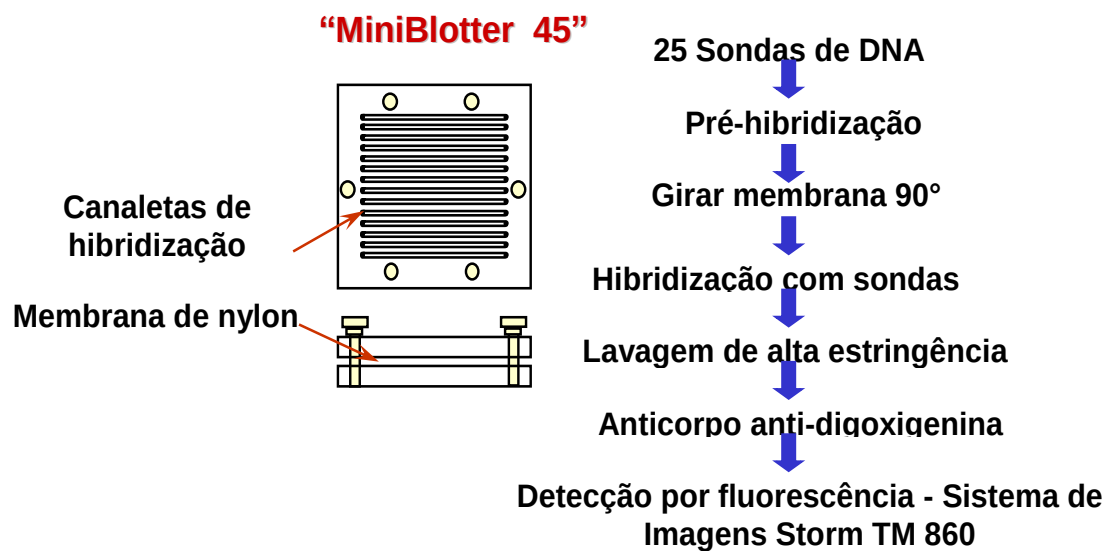


Figura 4. Esquema do aparato “Miniblotter 45” (Immuntetics) e da hibridização com as sondas de DNA.

Tabela 2. Relação das cepas microbianas empregadas na confecção das sondas de DNA.

Bactéria	ATCC	Bactéria	ATCC
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	<i>Lactobacillus casei</i>	7469
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860	<i>Lactobacillus oris</i>	49062
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201
<i>Actinomyces meyeri</i>	35568	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	21824
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104	<i>Neisseria lactamia</i>	23970
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	<i>Neisseria meningitis</i>	13077
<i>Actinomyces oris</i>	43146	<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a</i>	29523	<i>Neisseria polysaccharea</i>	43768
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans b</i>	43718	<i>Neisseria sicca</i>	29256
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans c</i>	652	<i>Neisseria subflava</i>	49275
<i>Campylobacter concisus</i>	484	<i>Olsenella uli</i>	49627
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Pantoea agglomerans</i>	27155
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Parvimonas micra</i>	33270
<i>Campylobacter showae</i>	51146	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337
<i>Candida albicans</i>	10231	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
<i>Clostridium difficile</i>	9689	<i>Prevotella tannerae</i>	51259
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	<i>Propionibacterium acnes I</i>	11827
<i>Dialister pneumosintes</i>	GBA27	<i>Propionibacterium acnes II</i>	11828
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145
<i>Escherichia coli</i>	10799	<i>Rothia dentocariosa</i>	17931
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	<i>Salmonella enteric serovar Typhi</i>	6539
<i>Enterobacter cloacae</i>	10699	<i>Selenomonas noxia</i>	43541
<i>Enterobacter gergoviae</i>	33028	<i>Serratia liquefaciens</i>	11367

<i>Enterobacter sakazakii</i>	12868	<i>Serratia marcescens</i>	13477
<i>Enterococcus faecalis</i>	10100	<i>Staphylococcus aureus</i> ss <i>aureus</i> (MRSA)	33591
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	<i>Staphylococcus warneri</i>	27836
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Eubacterium saphenum</i>	49989	<i>Streptococcus</i> <i>constellatus</i>	27823
<i>Filifactor alocis</i>	35896	<i>Streptococcus</i> <i>epidermidis</i>	14990
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss. <i>Vincentii</i>	49256	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Fusobacterium nucleatum</i> sp. <i>Polymorphum</i>	10953	<i>Streptococcus</i> <i>intermedius</i>	27335
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss. <i>Nucleatum</i>	25586	<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	<i>Streptococcus mutans</i>	25175T
<i>Gemella haemolysans</i>	10379	<i>Streptococcus oralis</i>	35037
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i>	49619
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	33389	<i>Streptococcus salivarius</i>	27945
<i>Haemophilus influenzae</i>	33533	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Hafnia alvei</i>	11604	<i>Streptococcus sobrinus</i>	3347
<i>Helicobacter pylori</i>	43504	<i>Tannerella forsythia</i>	43037
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12833	<i>Treponema denticola</i>	B1b*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	<i>Treponema socranskii</i>	D40DR2*
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356	<i>Veillonella parvula</i>	10790

ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)

* The Forsyth Institute, Boston, MA

4.5 Análise dos dados

Os dados foram analisados em um pacote estatístico (IBM SPSS Statistics Version 19, IBM, Armonk, USA). Os dados demográficos foram apresentados como porcentual de distribuição entre os grupos, exceto para idade para a qual se calculou uma média por grupo. Médias dos parâmetros antropométricos foram calculadas por grupo. Os dados clínicos periodontais BD, SG, SS e/ ou SU foram apresentados como porcentual por indivíduos e depois dentro do grupo, assim como as médias em mm de PS e do NCI e as médias dos dados microbiológicos (níveis e frequências). A distribuição dos diagnósticos periodontais foram calculados de acordo com os grupos de estudo. Diferenças significativas para as variáveis foram testadas através dos testes Qui-quadrado, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Associações entre os parâmetros sociodemográficos, antropométricos e clínicos periodontais e os níveis dos microrganismos estudados foram testadas através do Coeficiente de Correlação de Spearman. O nível de significância utilizado foi de 5%.

5 Resultados

A seleção dos indivíduos participantes do presente estudo está apresentada na Figura 5. Foram incluídos oitenta e cinco indivíduos originários dos cursos de graduação e/ou funcionários da Unigranrio. De acordo com o IMC, os participantes foram alocados em três grupos, 34 no grupo Eutrófico, 28 no grupo Sobrepeso e 23 no grupo Obeso.



Figura 5. Fluxograma da amostra populacional do estudo.

5.1 Dados Demográficos

Os dados referentes à idade, gênero, raça, ocupação e nível educacional dos indivíduos participantes, de acordo com os grupos estudados estão apresentados na Tabela 3. A idade média da amostra foi de $23,2 \pm 4,1$ e não diferiu estatisticamente entre os grupos. Embora a maioria dos participantes tenha sido constituída por mulheres, a distribuição de gênero não diferiu estatisticamente entre os grupos estudados. Os dados referentes a distribuição da raça, assim como o nível de escolaridade e ocupação foram semelhantes entre os grupos.

Tabela 3. Dados demográficos da população de estudo de acordo com os grupos estudados.

Variáveis	Eutrófico (n = 34)	Sobrepeso (n = 28)	Obeso (n = 23)	Todos (n = 85)	Valor de p
Idade média (± desvio padrão)	22,4 ± 3,7	24,1 ± 4,7	23,4 ± 3,7	23,2 ± 4,1	NS *
Gênero (% homens)	32,4	42,9	30,4	35,3	NS †
Raça (%)					
Branca	47,1	28,6	39,1	38,8	NS †
Preta	23,5	14,3	26,1	21,2	
Parda	29,4	57,1	34,8	40	
Ocupação (%)					
Estudante	70,6	64,3	78,3	70,6	NS †
Funcionário	14,7	10,7	13	12,9	
Estudante e funcionário	14,7	25	8,7	16,5	
Nível educacional					
Médio completo	17,6	7,1	4,3	10,6	NS †
Superior incompleto	73,5	71,4	82,6	75,3	
Superior completo	8,8	21,4	13	14,1	

*teste Kruskal-Wallis; [†]teste do Qui-quadrado. NS: não significativa.

5.2 Dados Antropométricos

Na Tabela 4 estão demonstrados os registros referentes ao IMC, à altura (m), ao peso (kg), à CC (cm), à CQ (cm) e a PCQ, encontrados para os grupos estudados. Como esperado, todos estes parâmetros, com exceção dos valores médios de altura, diferiram significativamente entre os grupos e foram mais elevados no grupo Obeso ($p < 0,001$; teste Kruskal-Wallis).

Tabela 4. Dados antropométricos dos grupos estudados.

Parâmetros	Grupos			Valor de P*
	Eutróficos (N = 34)	Sobrepeso (N = 28)	Obeso (N = 23)	
IMC (kg/m ²)	22,1 ± 1,7	27,53 ± 1,3	34,91 ± 4,3	< 0,0001
Altura (m)	1,65 ± 0,09	1,67 ± 0,09	1,64 ± 0,09	NS
Peso (Kg)	60,6 ± 8,98	77,19 ± 9,55	95,18 ± 15,81	< 0,0001
Circunferência de cintura (cm)	78,07 ± 6,55	89,03 ± 6,81	105,60 ± 10,17	< 0,0001
Circunferência de quadril (cm)	95,3 ± 5,87	104,23 ± 3,58	115,21 ± 8,94	< 0,0001
Proporção cintura-quadril	0,81 ± 0,05	0,85 ± 0,06	0,91 ± 0,08	< 0,0001

*teste Kruskal-Wallis.

5.3 Dados do Exame Periodontal

Os dados obtidos quanto aos parâmetros clínicos periodontais estão demonstrados na Tabela 5. Os índices de cálculo dental e biofilme dental apresentaram maior extensão e frequência nos grupos Sobrepeso e Obeso. Estes dados diferiram significativamente entre os grupos estudados ($p < 0,05$; teste Kruskal-Wallis) e demonstraram haver um aumento gradativo de acordo com o aumento do IMC. Para o índice de cálculo dental ocorreu diferença significativa entre os grupos Eutrófico e Sobrepeso, e Eutrófico e Obeso. Quanto ao índice de biofilme dental, este foi mais frequente no grupo obeso, e diferiu significativamente do grupo Sobrepeso ($p < 0,01$; teste Mann-Whitney). Embora os dados de sangramento gengival e à sondagem tenham apresentado uma tendência de aumento gradativo entre os grupos, estes percentuais não diferiram estatisticamente. Quanto aos percentuais de PS rasa, PS moderada, NCI raro, NCI moderado e NCI avançado demonstraram distribuição semelhante entre os três grupos. Da mesma maneira, as médias de PS e NCI não diferiram significativamente entre os grupos.

Tabela 5. Médias ($\pm$ erro-padrão) encontradas para os dados clínicos obtidos dos grupos estudados.

Parâmetros	Eutrófico (n = 34)	Sobrepeso (n = 28)	Obeso (n = 23)	Todos (n = 85)	Valor de p
% de ($\pm$ EP):					
Cálculo dental	9,21 $\pm$ 3,29	11,44 $\pm$ 2,02	12,32 $\pm$ 1,84	10,78 $\pm$ 1,55	0,01 * [†]
Biofilme dental	22,10 $\pm$ 3,71	25,49 $\pm$ 3,69	36,5 $\pm$ 5,3	27,14 $\pm$ 2,46	0,01* [†]
Sangramento gengival	13,66 $\pm$ 4,5	8,07 $\pm$ 1,56	22,44 $\pm$ 6,0	14,5 $\pm$ 2,57	NS
Sangramento à sondagem	17,4 $\pm$ 3,63	20,24 $\pm$ 3,78	25,0 $\pm$ 4,9	20,4 $\pm$ 2,34	NS
Supuração	0	0	0,6 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,1	NS
PS rasa (0-3 mm)	96,24 $\pm$ 1,12	93,33 $\pm$ 1,58	93,69 $\pm$ 2,06	94,61 $\pm$ 0,88	NS
PS moderada (4-6 mm)	3,75 $\pm$ 1,12	6,66 $\pm$ 1,53	6,30 $\pm$ 2,06	5,39 $\pm$ 0,88	NS
NCI leve (0-3 mm)	99,43 $\pm$ 0,31	96,10 $\pm$ 3,69	99,47 $\pm$ 0,40	98,37 $\pm$ 1,19	NS
NCI moderado (4-6 mm)	0,54 $\pm$ 0,31	0,19 $\pm$ 0,08	0,52 $\pm$ 0,40	0,42 $\pm$ 0,17	NS
NCI avançado (> 6 mm)	0,01 $\pm$ 0,01	0	0	0	NS
Média de ($\pm$ EP):					
PS	2,05 $\pm$ 0,05	2,19 $\pm$ 0,07	2,23 $\pm$ 0,08	2,14 $\pm$ 0,05	NS
NCI	1,98 $\pm$ 0,02	2,00 $\pm$ 0,0	2,02 $\pm$ 0,02	2,00 $\pm$ 0,01	NS

*teste Kruskal-Wallis; [†]teste do Mann-Whitney. NS: não significante.

5.4 Diagnóstico Periodontal

Os dados referentes ao diagnóstico periodontal estão demonstrados nas Figuras 6 (grupos Eutrófico, Sobrepeso e Obeso) e 7 (Grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso). No todo, 53,6% dos indivíduos apresentavam gengivite (dados não mostrados). A maioria dos indivíduos portadores de gengivite constituíram os grupos Sobrepeso (55,6%) e Obeso (69,6%), enquanto o grupo Eutrófico apresentou 41,2%. Quanto ao diagnóstico de periodontite, foram encontrados 4 indivíduos (11,8%) no grupo Eutrófico, 2 (7,4%) no grupo Sobrepeso e 1 (4,3%) no grupo obeso (figura 6). Após a dicotomia dos grupos em Eutrófico e Sobrepeso/Obeso, a frequência de gengivite e periodontite no grupo Sobrepeso/Obeso foi de 62% e de 6%, respectivamente (figura 7). No entanto, para ambas as estratégias de agrupamento, os achados tanto de gengivite quanto de periodontite não diferiram significativamente entre os grupos.

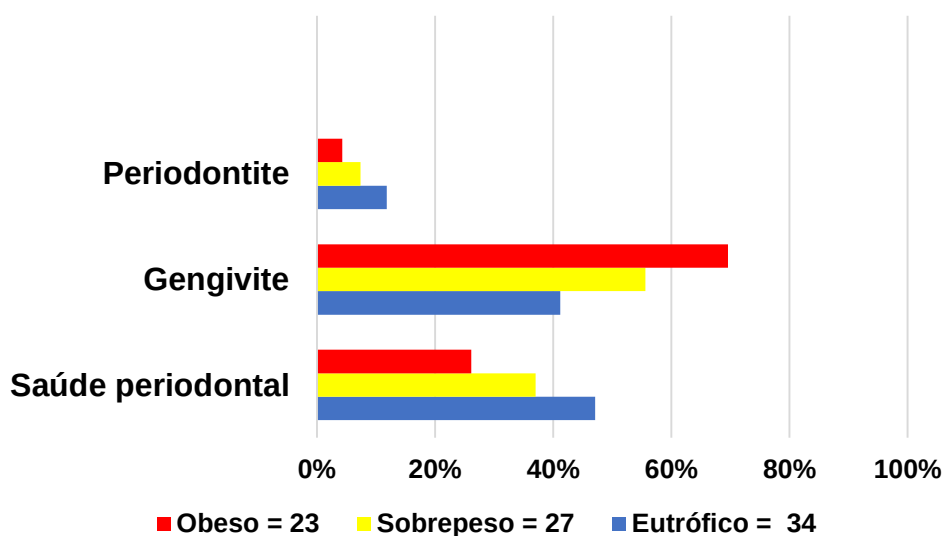


Figura 6. Distribuição do diagnóstico periodontal de acordo com os grupos estudados (Eutrófico, Sobrepeso e Obeso).

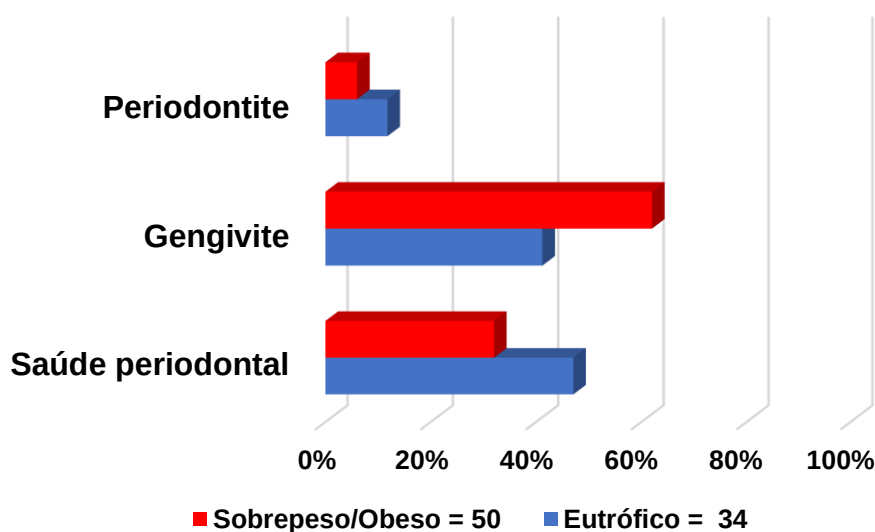


Figura 7. Distribuição do diagnóstico periodontal nos grupos dicotomizados (Eutrófico e Sobrepeso/Obeso).

5.5 Análise microbiológica

Através do método do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* foram analisadas 340 amostras de biofilme dental, a partir do material coletado de 85 indivíduos. As amostras de biofilme foram hibridizadas com sondas genômicas confeccionadas a partir do DNA de 90 espécies de microrganismos orais e extra-orais. Foram analisadas a frequência e os níveis das espécies microbianas orais e extra-orais nos grupos estudados.

A composição do biofilme dental subgingival dos grupos clínicos Eutrófico, Sobrepeso e Obeso, e Eutrófico, Sobrepeso/Obeso (análise dicotômica) foi apresentada de acordo com a classificação das espécies microbianas em orais e extra-orais.

Os resultados obtidos para a frequência das espécies orais nos três grupos clínicos estudados (Eutrófico, Sobrepeso e Obeso) estão demonstrados na figura 8. Dentre as espécies orais estudadas, a frequência da bactéria *Eikenella corrodens* diferiu estatisticamente entre os três grupos ($p = 0,005$; teste Kruskal-Wallis) e apresentou maior prevalência no grupo Eutrófico. Após análise

comparativa aos pares, os resultados foram estatisticamente significativos entre os grupos Eutrófico e Sobrepeso, e Eutrófico e Obeso, mas não entre os grupos Sobrepeso e Obeso ($p < 0,05$; teste Mann-Whitney). A análise de frequência dos grupos de estudo de forma dicotomizada, comparando o grupo Eutrófico a um grupo Sobrepeso/Obeso estão demonstrados na Figura 9. Os dados obtidos a partir desta estratégia de agrupamento demonstraram que a frequência de espécies orais foi semelhante entre os grupos, com exceção de *E. corrodens*. Esta espécie foi significativamente mais prevalente no grupo Eutrófico ($p = 0,001$; teste Mann-Whitney), semelhante aos dados obtidos a partir da análise dos três grupos.

Quanto aos níveis das bactérias orais estudadas, as espécies *Lactobacillus spp.* e *P. gingivalis* diferiram significativamente quando os três grupos foram comparados ($p < 0,05$; teste Kruskal-Wallis), como demonstrado na Figura 10. Níveis mais elevados de *Lactobacillus spp.* foram encontrados no grupo Sobrepeso, e diferiram significativamente após comparação com o grupo Eutrófico ($p = 0,005$; teste Mann-Whitney). Quanto à espécie *P. gingivalis*, níveis significativamente maiores foram encontrados em Sobrepeso ($p = 0,008$) e Obeso ($p = 0,048$) comparados a Eutrófico. A análise dos níveis microbianos após dicotomização dos grupos de estudo também demonstrou que o grupo Sobrepeso/ Obeso apresentou níveis significativamente maiores das espécies orais *Lactobacillus spp.* e *P. gingivalis* ($p < 0,05$). Além disto, foi ainda encontrado que os níveis das espécies *E. corrodens* e *T. denticola* foram significativamente maiores no grupo Eutrófico comparados ao grupo Sobrepeso/Obeso ($p < 0,05$), como apresentado na Figura 11.

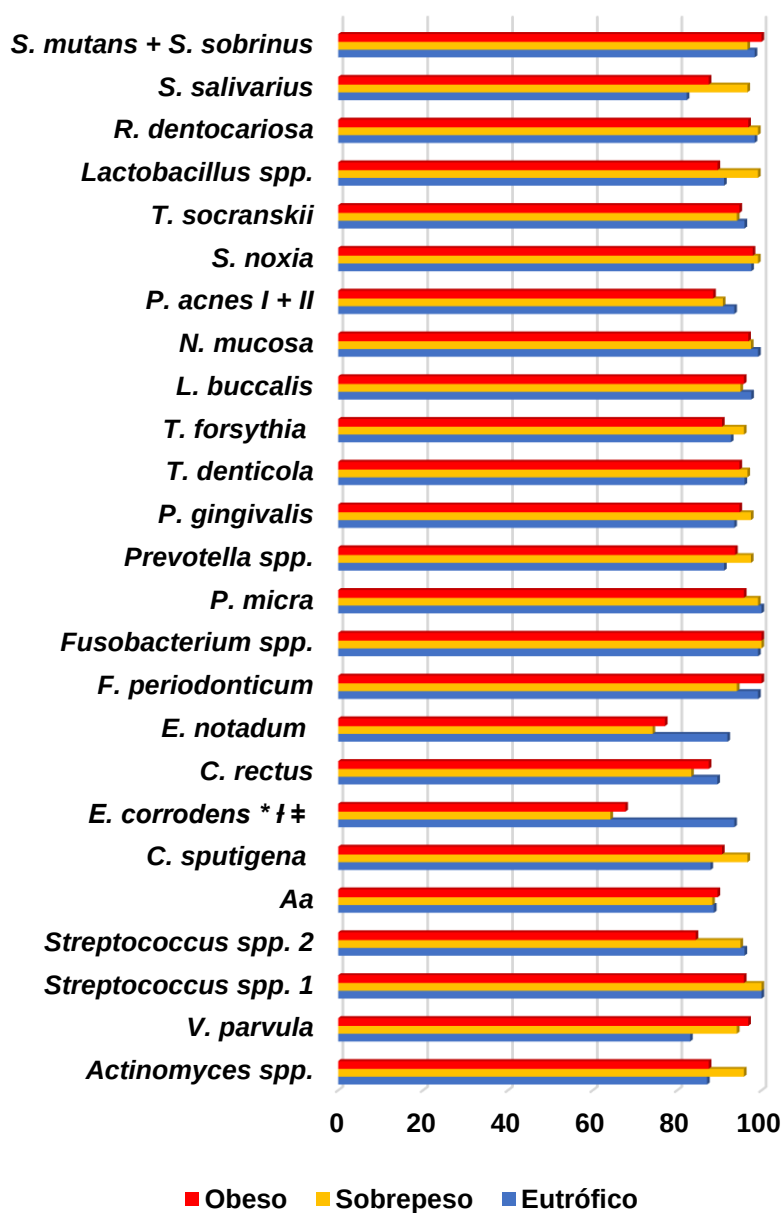


Figura 8. Frequência de microrganismos orais detectados nos três grupos estudados (Eutrófico, Sobrepeso e Obeso). * $p = 0,005$, teste Kruskal-Wallis. † $p < 0,05$, teste Mann-Whitney, entre os grupos Eutrófico e sobrepeso; ‡ $p < 0,05$, teste Mann-Whitney, entre os grupos Eutrófico e Obeso.

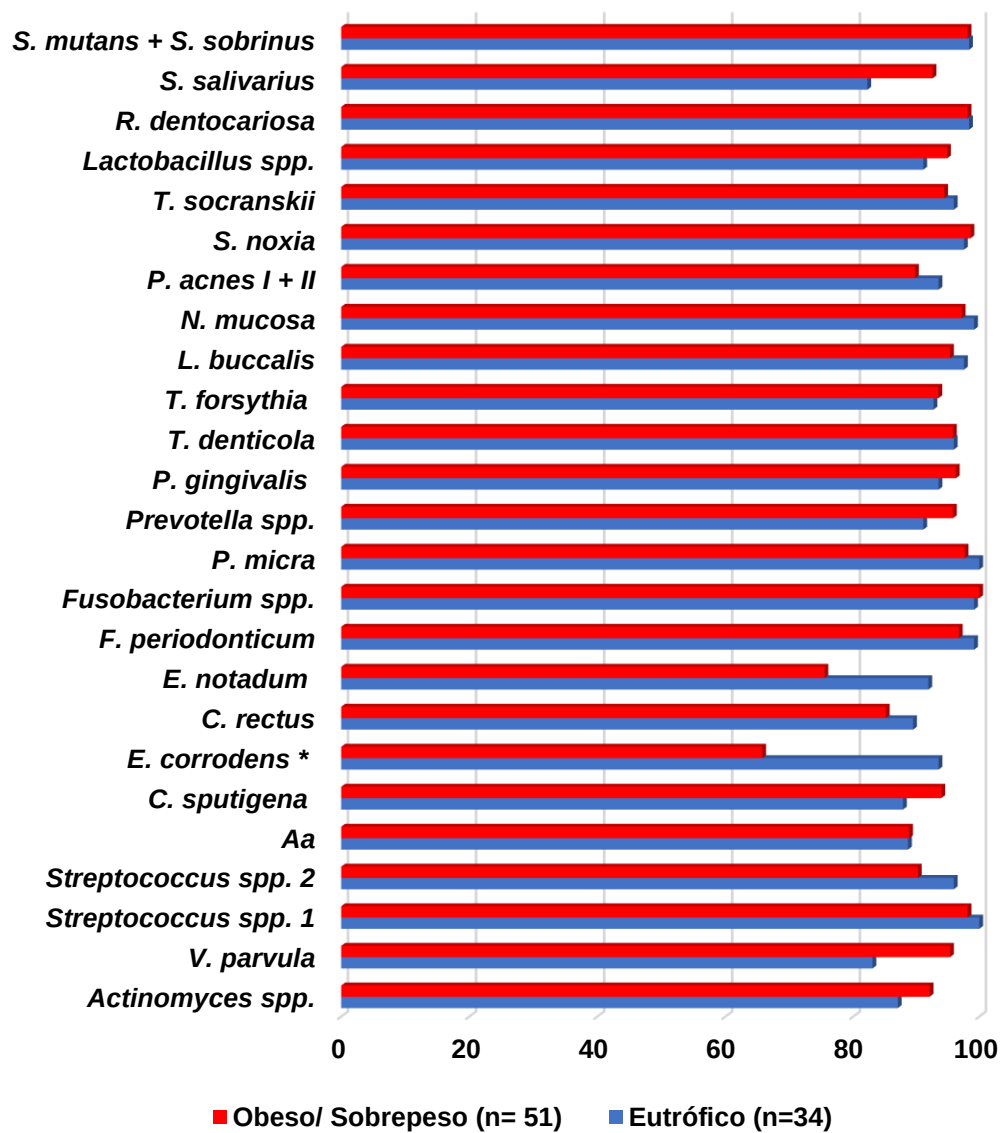


Figura 9. Frequência de microrganismos orais detectados nos grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso. * $p < 0,05$, Teste Mann-Whitney.

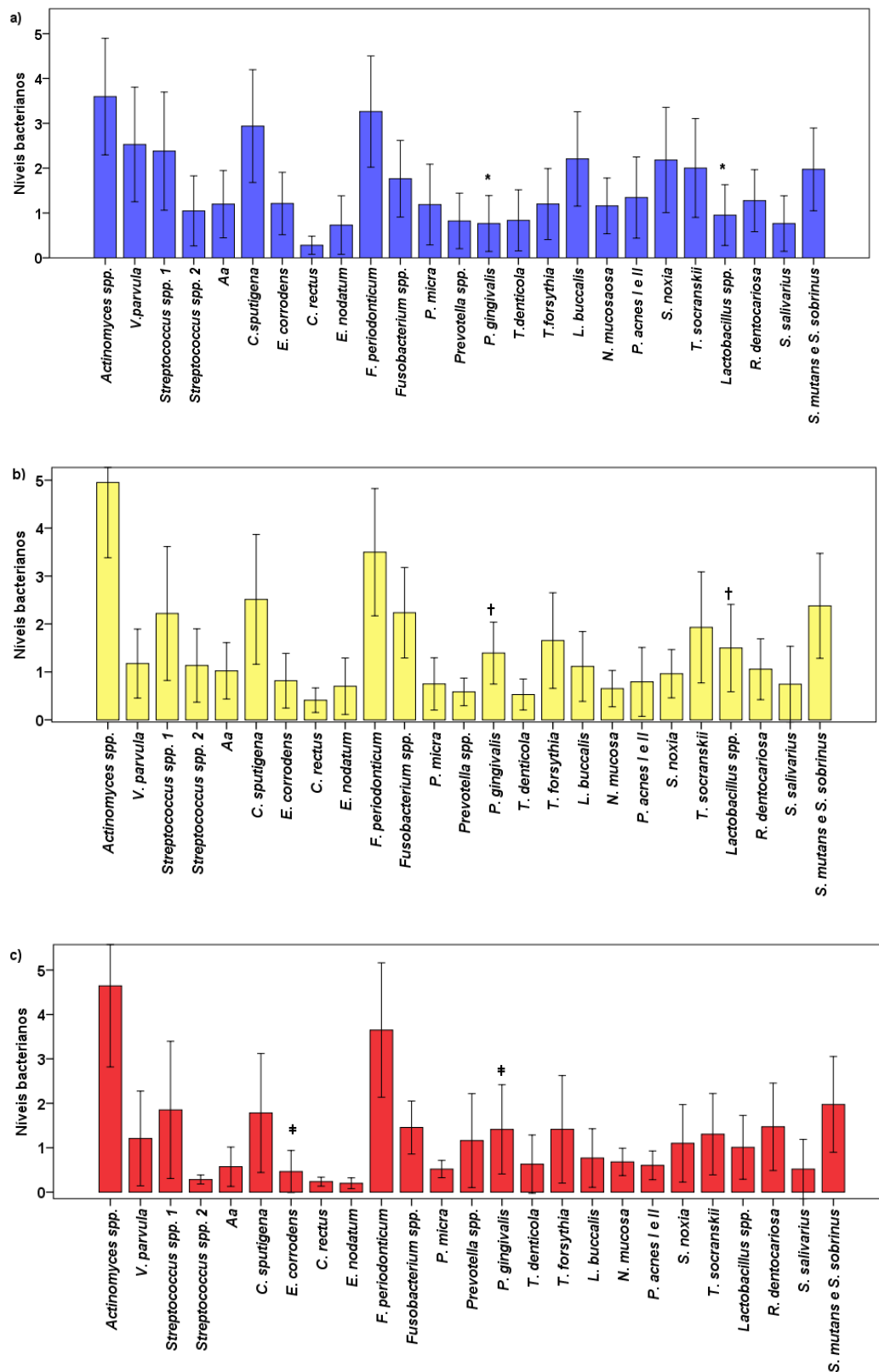


Figura 10. Média dos níveis (x 10⁶) de microrganismos orais detectados. **a)** Eutrófico; **b)** Sobrepeso; **c)** Obeso. *teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. † diferença entre os grupos Eutrófico e Sobrepeso; ‡ diferença entre os grupos Eutrófico e Obeso ($p < 0,05$; teste Mann-Whitney).

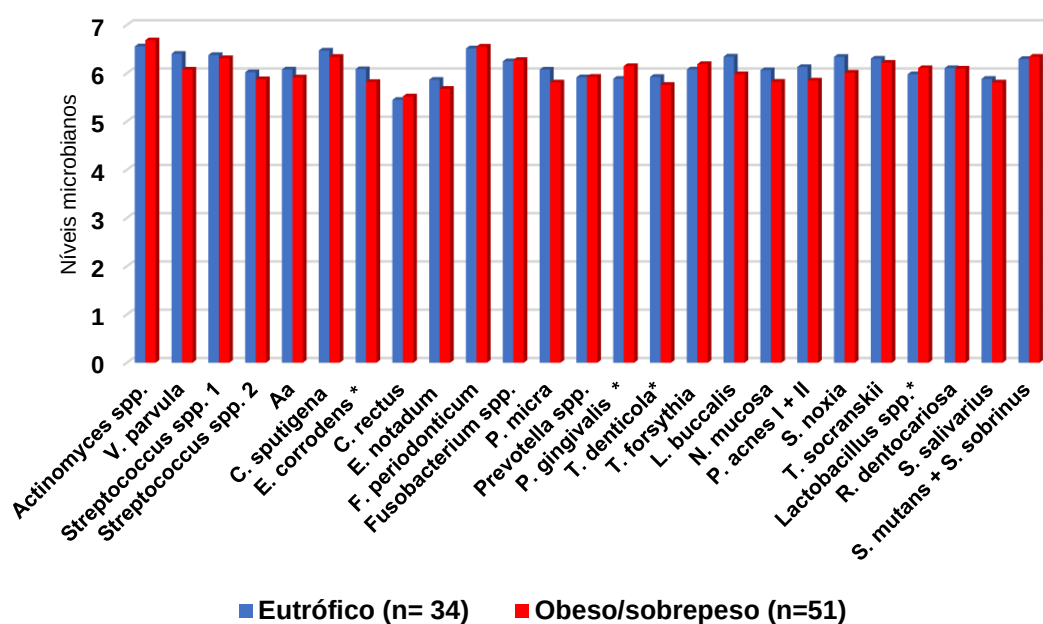


Figura 11. Média dos níveis ($\times 10^6$) de microrganismos orais detectados nos grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso. * $p < 0,05$, Teste Mann-Whitney.

A análise microbiológica para os microrganismos extra-orais demonstrou grande diversidade de espécies extra-orais presentes no biofilme subgengival. Entre as espécies estudadas, a frequência da espécie *Salmonella enterica* serovar Typhi diferiu significativamente entre os três grupos estudados ($p = 0,046$; teste Kruskal-Wallis) como demonstrado na Figura 12. Na comparação entre os grupos Eutrófico e Obeso, demonstrou-se que *S. enterica* foi mais frequentemente detectada em Obeso ($p = 0,024$; teste Mann-Whitney). Quanto às frequências das espécies extra-orais após análise dicotômica, foi observado que *D. pneumosintes*, *H. pylori* e *S. enterica* apresentaram frequências significativamente mais elevadas no grupo Sobrepeso/Obeso comparado ao grupo Eutrófico ($p < 0,05$; teste Mann-Whitney). Contrariamente, a levedura *C. albicans* demonstrou frequência significativamente maior no grupo Eutrófico comparado ao grupo Sobrepeso/ Obeso ($p = 0,017$), como pode ser observado na Figura 13.

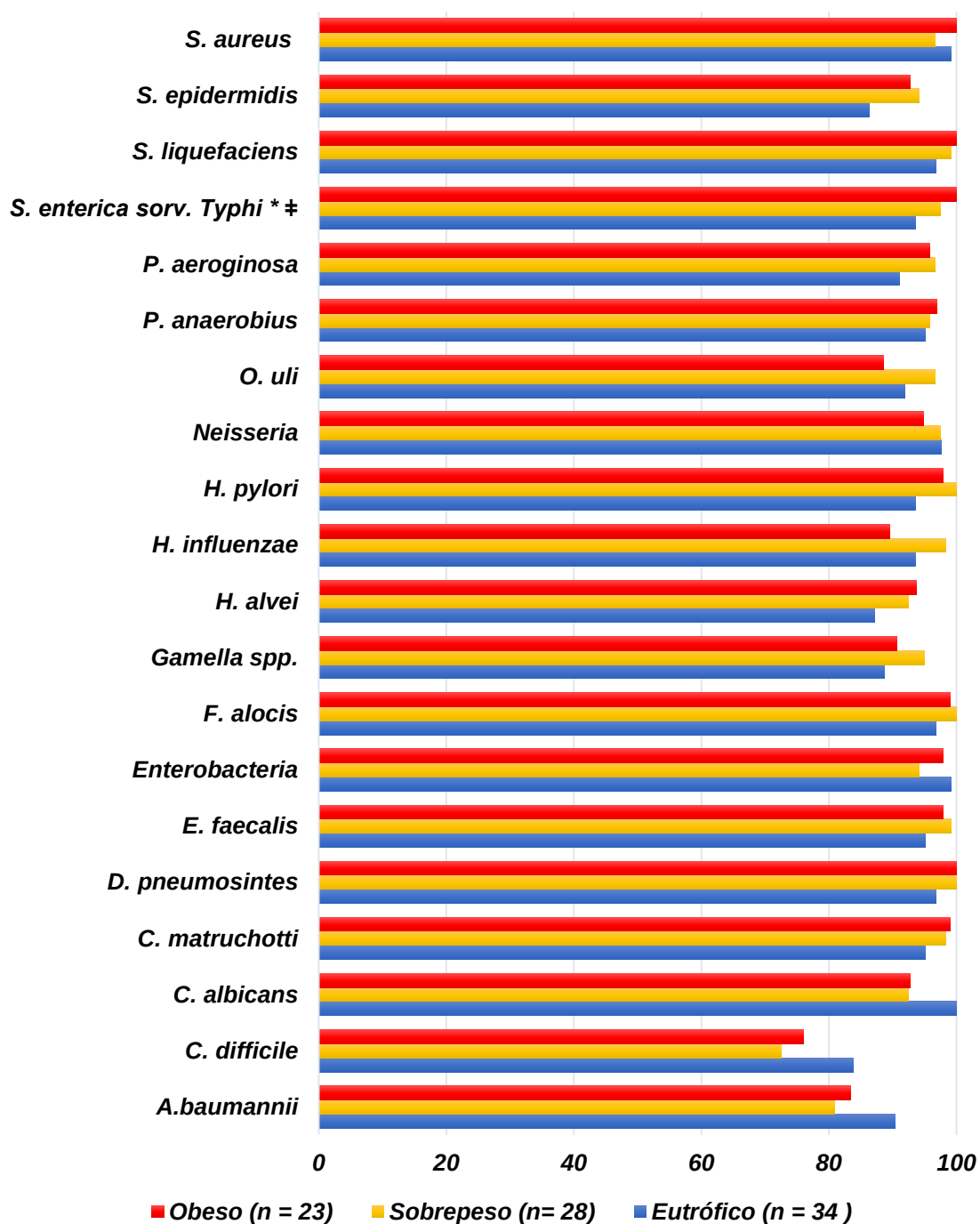


Figura 12. Frequência de microrganismos extra-orais detectados nos três grupos estudados (Eutrófico, Sobrepeso e Obeso). *teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. † diferença entre os grupos Eutrófico e sobrepeso; ‡ diferença entre os grupos Eutrófico e Obeso ($p < 0,05$; teste Mann-Whitney).

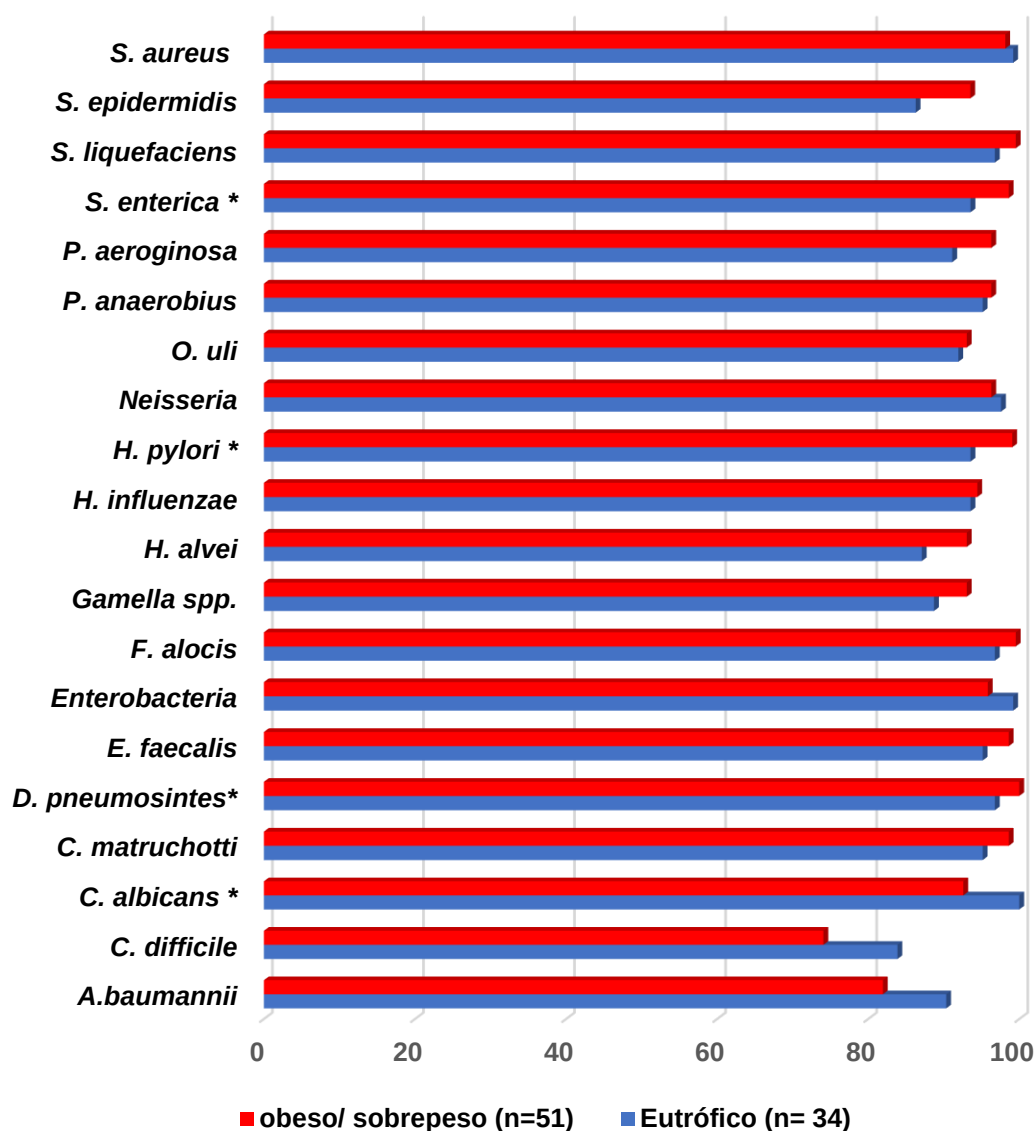


Figura 13. Frequência de microrganismos extra-orais detectados nos grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso. * $p < 0,05$, Teste Mann-Whitney.

Entre as espécies extra-orais, observou-se que os níveis das espécies *H. influenzae* e *O. uli* diferiram significativamente entre os três grupos estudados ($p < 0,05$; teste Kruskal-Wallis), como apresentado na Figura 14. Análise aos pares demonstrou que o grupo Eutrófico apresentou níveis significativamente menores das espécies *H. influenzae* e *O. uli* quando comparado aos grupos Sobrepeso e Obeso ($p < 0,05$; teste Mann-Whitney).

A análise dos níveis microbianos após dicotomização dos grupos de estudo demonstrou que o grupo Sobrepeso/ Obeso apresentou níveis

significativamente maiores das espécies extra-orais *C. albicans*, *Enterobacteria spp.*, *H. influenzae*, *O.uli* e *P. aeruginosa* (figura 15). Os níveis destas espécies foram significativamente maiores no grupo Sobrepeso/ Obeso comparado ao Eutrófico.

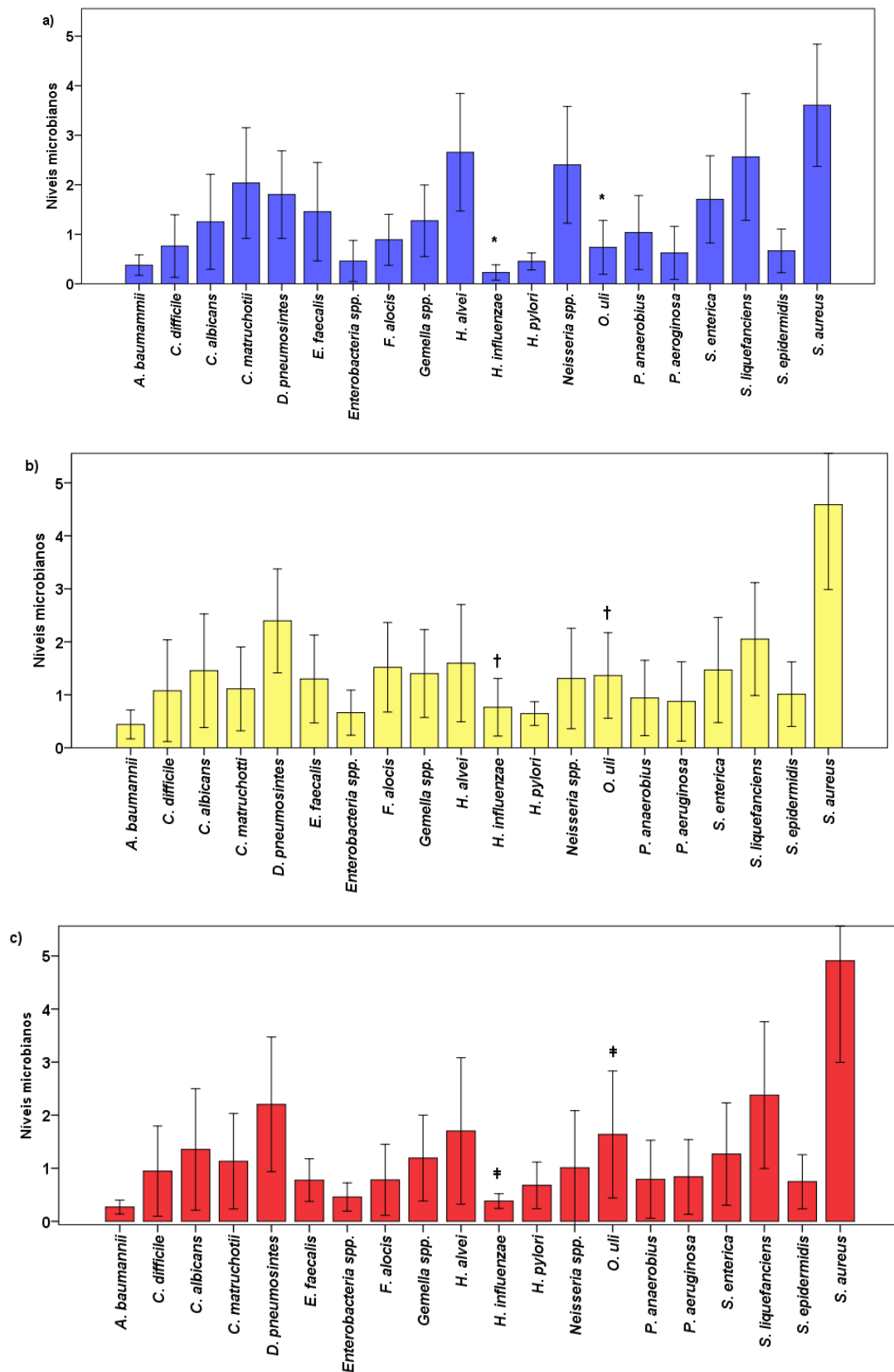


Figura 14. Média dos níveis ($\times 10^6$) de microrganismos extra-orais detectados. **a)** Eutrófico; **b)** Sobrepeso; **c)** Obeso. *teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. † diferença entre os grupos Eutrófico e Sobrepeso; ‡ diferença entre os grupos Eutrófico e Obeso ($p < 0,05$; teste Mann-Whitney).

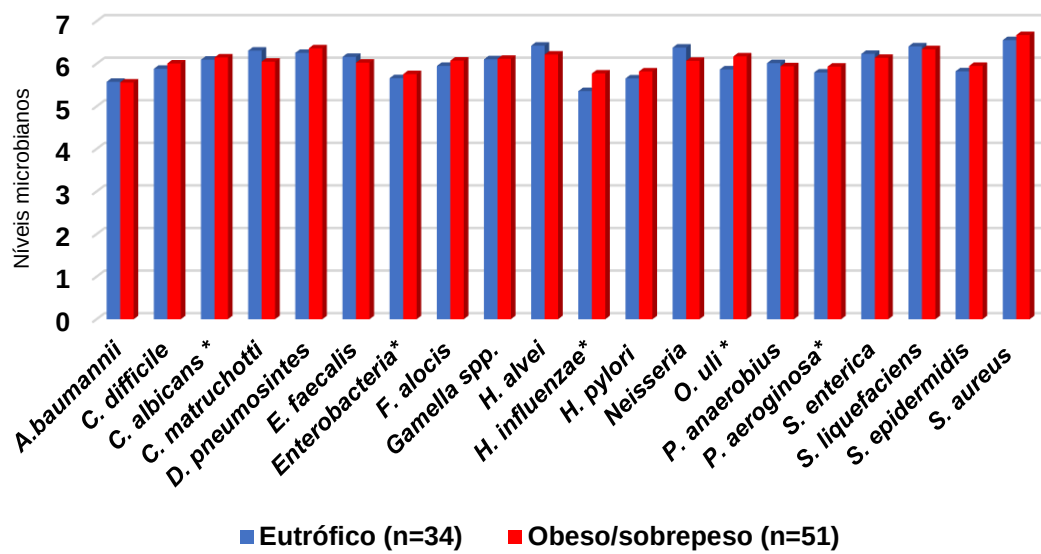


Figura 15. Média dos níveis ($\times 10^6$) de microrganismos extra-orais detectados nos grupos Eutrófico e Sobrepeso/Obeso. * $p < 0,05$, Teste Mann-Whitney.

5.6 Análise de Correlação

A análise de correlação bivariada demonstrou existir associações significativas entre os níveis bacterianos e os parâmetros sociodemográficos (dados não mostrados), antropométricos e clínicos periodontais. As associações mais fortes foram encontradas para o ISG e as espécies bacterianas orais *E. corrodens* ($\rho = 0,535$; $p < 0,0001$), *P. micra* ($\rho = 0,483$; $p < 0,002$), *T. socranskii* ($\rho = 0,407$; $p < 0,0001$), e para a espécie extra-oral *H. influenzae* ($\rho = 0,418$; $p = 0,001$). Estes dados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Análise de correlação entre índice de sangramento gengival (ISG) e espécies bacterianas estudadas.

Variáveis	ρ * (valor de p)			
	<i>E. corrodens</i>	<i>P. micra</i>	<i>T. socranskii</i>	<i>H. influenzae</i>
ISG	0,535	0,483	0,407	0,418
	(< 0,0001)	(< 0,002)	(< 0,0001)	(0,001)

* ρ : coeficiente de correlação de Spearman.

Associações significativas positivas, porém fracas, foram encontradas entre os níveis microbianos e os parâmetros antropométricos avaliados. Estes dados estão demonstrados nas tabelas 7 (espécies microbianas orais) e 8 (espécies microbianas extra-orais). Houve associação significativa entre peso e os níveis de *E. faecalis* ($\rho = 0,237$; $p = 0,029$), *H. influenzae* ($\rho = 0,259$; $p = 0,017$) e *O. uli* ($\rho = 0,262$; $p = 0,015$); entre a medida de CQ e as espécies *E. corrodens* ($\rho = -0,223$; $p = 0,040$), *C. rectus* ($\rho = 0,220$; $p = 0,043$), *T. denticola* ($\rho = 0,262$; $p = 0,015$), *L. buccalis* ($\rho = -0,281$; $p = 0,009$), *C. albicans* ($\rho = 0,240$; $p = 0,027$), *Enterobacteria spp.* ($\rho = 0,254$; $p = 0,019$), *H. influenzae* ($\rho = 0,255$; $p = 0,018$) e *O. uli* ($\rho = 0,236$; $p = 0,030$); entre a medida de PCQ e *P. gingivalis* ($\rho = 0,266$; $p = 0,014$), *E. faecalis* ($\rho = 0,270$; $p = 0,012$) e *O. uli* ($\rho = 0,242$; $p = 0,026$); entre IMC e *E. corrodens* ($\rho = 0,259$; $p = 0,017$), *T. denticola* ($\rho = 0,262$; $p = 0,015$), *L. buccalis* ($\rho = 0,259$; $p = 0,017$), *Enterobacteria spp.* ($\rho = 0,254$; $p = 0,019$) *H. influenzae* ($\rho = 0,259$; $p = 0,017$), *O. uli* ($\rho = 0,262$; $p = 0,015$) e *P. aeruginosa* ($\rho = 0,254$; $p =$

0,019); e entre a medida de CC e *Actinomyces spp.* ($\rho = 0,237$; $p = 0,029$), *C. rectus* ($\rho = 0,224$; $p = 0,039$), *P. gingivalis* ($\rho = 0,229$; $p = 0,035$) *T. denticola* ($\rho = 0,271$; $p = 0,012$), *E. faecalis* ($\rho = 0,225$; $p = 0,038$) *Enterobacteria spp.* ($\rho = 0,274$; $p = 0,011$) *H. influenzae* ($\rho = 0,264$; $p = 0,014$) e *O. uli* ($\rho = 0,219$; $p = 0,03$).

Tabela 7. Análise de correlação entre os níveis das espécies microbianas orais estudadas e os parâmetros antropométricos avaliados.

Variáveis	<i>rho</i> * (valor de <i>p</i>)					
	Altura	Peso	IMC	CC	CQ	RCQ
<i>Actinomyces spp.</i>	--	--	--	0,237 (0,029)	--	--
<i>E. corrodens</i>	--	--	- 0,255 (0,019)	--	- 0,223 (0,040)	--
<i>C. rectus</i>	--	--	--	224 (0,039)	- 0,220 (0,043)	--
<i>P. gingivalis</i>	--	--	--	0,229 (0,035)	--	0,226 (0,014)
<i>T. denticola</i>	--	--	0,259 (0,017)	0,271 (0,012)	0,262 (0,015)	--
<i>L. buccalis</i>	--	--	- 0,215 (0,048)	--	- 0,281 (0,009)	--

**rho*: coeficiente de correlação de Spearman.

Tabela 8. Análise de correlação entre os níveis das espécies microbianas extra-orais estudadas e os parâmetros antropométricos avaliados.

Variáveis	<i>rho</i> * (valor de <i>p</i>)					
	Altura	Peso	IMC	CC	CQ	RCQ
<i>C. albicans</i>	--	--	--	--	0,240 (0,027)	--
<i>C. difficile</i>	0,236 (0,030)	--	--	--	--	--
<i>E. faecalis</i>	--	0,237 (0,029)	--	0,225 (0,038)	--	0,270 (0,012)
<i>Enterobacteria spp.</i>	--	--	0,295 (0,006)	0,274 (0,011)	0,259 (0,019)	--
<i>H. influenzae</i>	--	0,259 (0,017)	0,325 (0,002)	0,264 (0,014)	0,255 (0,018)	--
<i>O. uli</i>	--	0,262 (0,015)	0,354 (0,001)	0,319 (0,003)	0,236 (0,030)	0,242 (0,026)
<i>P. aeruginosa</i>	--	--	0,279 (0,010)	--	--	--

**rho*: coeficiente de correlação de Spearman.

6 Discussão

A obesidade é atualmente reconhecida como um grave e crescente problema de saúde pública em diferentes populações (WHO, 2013). Frente às consequências associadas à obesidade e ao seu impacto na saúde geral de indivíduos obesos, diversos estudos têm direcionado o seu olhar para investigar possíveis correlações entre a obesidade e o desenvolvimento de comorbidades (WELLEN *et al.*, 2007; HALL *et al.*, 2015). A descoberta de importantes funções secretoras do tecido adiposo, que demonstram um papel central da obesidade no desenvolvimento de inflamação sistêmica, e o seu papel em atividades metabólicas e imunológicas favoreceram essas investigações (YUDKIN, 2003; GRUNDY *et al.*, 2004). Nesta vertente, tem sido sugerido que a obesidade pode exercer um impacto negativo na saúde periodontal e, conseqüentemente, favorecer o desenvolvimento de doenças periodontais, como a gengivite e a periodontite (AL-ZAHRANI *et al.*, 2003; GENCO *et al.*, 2005; NISHIDA *et al.*, 2005; YLÖSTALO *et al.*, 2008; THANAKUN e IZUMI, 2016).

Baseado nessas evidências, hipotetizamos que a obesidade pode ser um fenômeno capaz de modular a composição microbiana periodontal e, conseqüentemente, favorecer a instalação e progressão das doenças periodontais. A partir desta hipótese, o presente estudo avaliou a composição microbiana do biofilme subgengival e a saúde periodontal de indivíduos adultos jovens com sobrepeso e obesidade.

Em relação aos parâmetros clínicos periodontais avaliados neste estudo, indivíduos com sobrepeso ou obesidade apresentaram maior frequência e extensão dos índices de cálculo dental e biofilme dental. Resultados similares foram demonstrados em um estudo de meta-análise desenvolvido por Li *et al* (2015), em que a obesidade em crianças e adolescentes, medida através do IMC, foi significativamente associada aos índices de placa visível (OR: 4,75; IC 95%: 2,42, 9,34) e cálculo subgengival (OR: 3,07; IC 95%: 1,10, 8,62). Naquela meta-análise, foi demonstrado que os índices de PS e sangramento à sondagem também foram significativamente associados à obesidade. Entretanto, estes dados da meta-análise não estão em alinhamento com os presentes achados. Apesar de ter sido demonstrado, no presente estudo, que há uma frequência

maior de gengivite e de parâmetros clínicos associados a esta doença nos grupos Sobrepeso e Obeso comparado a Eutrófico, estas diferenças não foram significativas entre os grupos.

No presente estudo, o percentual de indivíduos com gengivite foi de 53,6%. Dentre os indivíduos diagnosticados com gengivite, 69,6% eram obesos. Como mencionado anteriormente, a gengivite é a forma de doença periodontal mais frequente. Esta é caracterizada por um processo infecto-inflamatório da gengiva marginal, com quadro clínico e histológico reversíveis após a remoção do fator etiológico (AAP, 1999). Por outro lado, em indivíduos suscetíveis, esta poderia levar à instalação e progressão de periodontite (ARMITAGE, 1999). Na população estudada, foi detectada uma baixa frequência de periodontite (8,3%), com distribuição semelhante entre os grupos. Uma vez que o desenvolvimento de periodontite crônica está associado com o aumento da idade (SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2009; SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011), estes resultados foram condizentes com a faixa etária avaliada, constituída por adultos jovens. Tem-se demonstrado na literatura que existe uma associação positiva entre doença periodontal e obesidade, quando se classifica obesidade através do IMC em indivíduos adultos (CHAFFEE *et al.*, 2010; SUVAN *et al.*, 2011). Além disto, investigações mais recentes demonstraram que a obesidade central, medida através da CC está associada com pior saúde periodontal (PARK *et al.*, 2016; KANGAS *et al.*, 2017). Há evidências que demonstram que o acúmulo de gordura abdominal é um preditor crítico para complicações metabólicas e vasculares (KROTKIEWSKI *et al.*, 1983; WHO, 2003; FOX *et al.*, 2007; XIA *et al.*, 2016). Além disto, estudos sugerem que a intensa secreção de adipocinas como, TNF- α , IL-1, IL-6, entre outros mediadores pró-inflamatórios em indivíduos obesos, pode ser um evento predisponente ao desenvolvimento de doença periodontal (GENCO *et al.*, 2005; NISHIDA *et al.*, 2005; THANAKUN e IZUMI, 2016). Em consonância a estes achados, curiosamente, Al-Zahrani e colaboradores (2003) demonstraram que indivíduos magros apresentaram menor suscetibilidade à doença periodontal, quando comparados a indivíduos com excesso de peso.

Muitos estudos correlacionaram positivamente a ocorrência de sobrepeso, obesidade e doença periodontal. Contudo, a literatura atual carece de evidências que caracterizem a obesidade como um fator causal para as doenças que acometem o periodonto (LI *et al.*, 2015). Na tentativa de suprir essa necessidade, diversas hipóteses foram formuladas a fim de identificar os mecanismos fisiopatológicos que medeiam as duas doenças. Em suma, os resultados demonstram que a combinação de perfis metabólicos e inflamatórios exerce um impacto negativo na saúde gengival e são predisponentes ao estabelecimento da doença (SFASCIOTTI *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2016). Em uma outra vertente, Goodson e colaboradores (2009) propuseram que modificações na ecologia microbiana oral podem indicar um processo de adiposidade em curso. Por outro lado, já está bem estabelecido na literatura que a microbiota intestinal desempenha um papel importante na homeostase energética e, conseqüentemente, pode estar associada com o desenvolvimento da obesidade (LEY *et al.*, 2005; TURNBAUGH *et al.*, 2009; MILLION *et al.*, 2013). Entretanto, estudos que demonstrem a participação de espécies microbianas orais no processo de adiposidade, ou ainda, sobre a influência da obesidade na microbiota oral são escassos. No estudo de Goodson e colaboradores (2009), os autores identificaram diferenças significativas na composição microbiana da saliva de mulheres eutróficas e com excesso de peso. Naquele estudo a média percentual de sete espécies bacterianas presentes na saliva de mulheres com excesso de peso foi superior a 2%, quando comparadas a mulheres eutróficas, especialmente para a espécie *S. noxia* do filo Firmicutes. Proporções elevadas de espécies bacterianas do filo Firmicutes foram encontradas na microbiota intestinal de modelos experimentais de obesidade, e estavam associadas com ganho ponderal (LEY *et al.*, 2005; HILDEBRANDT *et al.*, 2009; DE FILIPPO *et al.*, 2010). Contudo, a participação ou o papel de espécies do filo Firmicutes na microbiota oral permanece desconhecida.

O biofilme subgengival abriga uma vasta diversidade de espécies microbianas que podem estar associadas à saúde ou à doença (COSTERTON *et al.*, 1999; HOLT e EBERSOLE, 2005). A proximidade deste biofilme com o epitélio gengival, permite um contato direto das espécies microbianas com

tecidos altamente vascularizados, o que poderia resultar em dano tecidual direto, ou ainda, por repercussão sistêmica por via hematogênica (COLOMBO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Com base na importância deste biofilme na patogênese das doenças periodontais e em processos patológicos que tenham repercussão sistêmica, o presente estudo avaliou os níveis e frequências de noventa espécies microbianas orais e extra-orais presentes no biofilme subgengival de indivíduos eutróficos, com sobrepeso e obesos. Os dados de frequência para as espécies orais na população de estudo foram semelhantes entre os grupos estudados, exceto para a espécie *E. corrodens* que foi significativamente mais elevado no grupo Eutrófico. Este bacilo gram-negativo anaeróbico facultativo faz parte da microbiota oral residente e sua atuação como patógeno oportunista foi raramente documentada (ELIKOWSKI *et al.*, 2017). Quanto aos níveis das espécies orais analisadas, comparando-se os 3 grupos de estudo, apenas a espécie *P. gingivalis* diferiu significativamente entre estes, tendo níveis mais elevados no grupo Obeso. A bactéria *P. gingivalis* é um periodontopatógeno-chave no desenvolvimento de doença periodontal destrutiva (SOCRASKY *et al.*, 1998), e na modulação do biofilme subgengival (SOCHALSKA *et al.*, 2017). Embora a frequência de periodontite em nossa população amostral não tenha sido substancial, indivíduos obesos apresentaram frequência elevada de doença periodontal em estágio inicial (gengivite). A presença de níveis elevados de *P. gingivalis* nestes indivíduos é um dado alarmante, pois, este pode favorecer a instalação e progressão da doença com o processo de envelhecimento. Neste sentido, Zeigler e colaboradores (2012) demonstraram que em uma população de adolescentes a obesidade estava associada a alterações na microbiota subgengival e observaram níveis elevados de *P. gingivalis* em indivíduos obesos. Naquele estudo, os níveis de patógenos periodontais em adolescentes obesos foram aproximadamente três vezes mais elevados, quando comparados aos controles eutróficos. Um estudo desenvolvido por Haffajee e Socransky (2009) demonstrou um aumento na contagem de células de *T. forsythia* em indivíduos adultos obesos. Estes achados reforçam a hipótese de que a obesidade pode ser um indicador de risco periodontal.

Os níveis e frequências de espécies extra-orais de importância clínica também foram avaliados neste estudo. Em consonância com outros estudos ecológicos, que avaliaram a presença de espécies extra-orais em sítios subgengivais (SOUTO e COLOMBO, 2008; PERSSON *et al.*, 2008; DA SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011; SOUTO *et al.*, 2014), os presentes achados demonstraram que, possivelmente, a cavidade oral pode atuar como um reservatório de espécies microbianas extra-orais (COLOMBO *et al.*, 2007). A participação destes microrganismos na saúde ou na doença ainda não está clara, uma vez que, como demonstrado aqui, espécies extra-orais também constituem o biofilme dental de indivíduos saudáveis. Por outro lado, níveis significativamente elevados de *P. aeruginosa* podem ser observados em indivíduos com periodontite crônica (DA SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011; SOUTO *et al.*, 2014). Este patógeno extra-oral oportunista é frequentemente associado a quadros graves de infecção respiratória (CHASTRE e FAGON, 2002). Interessantemente, níveis significativamente elevados desta bactéria foram encontrados no grupo Sobrepeso/Obeso estudado. Corroborando com os dados do presente estudo, Colombo e colaboradores (2016) identificaram elevada prevalência das espécies *C. albicans*, enterobactérias, *P. aeruginosa* e *O.uli* numa população constituída por indivíduos saudáveis ou com diferentes formas clínicas de doença periodontal. Curiosamente, naquele estudo, estas espécies foram mais relacionadas com inflamação periodontal e destruição tecidual naqueles indivíduos. Em contraste, os níveis destas espécies foram significativamente mais elevados no grupo Sobrepeso/Obeso aqui estudado. Além disto, no presente estudo, a espécie extra-oral *H. influenzae* e as espécies orais *E. corrodens*, *P. micra* e *T. socranskii* ($\rho = 0,407$; $p < 0,0001$), foram moderadamente associadas com inflamação periodontal medida através do ISG. Embora estas espécies orais não sejam classificadas como periodontopatógenos clássicos, alguns estudos de microbiologia oral realizados nas últimas décadas, fornecem evidências da possível participação destas espécies na etiologia das doenças periodontais (SANZ *et al.*, 2000; TAKEUCHI *et al.*, 2001; HAFFAJEE *et al.*, 2004). Contudo, vale ressaltar que a espécie *P. micra* faz parte do complexo laranja, o qual precede a colonização do complexo vermelho (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

Os resultados observados neste estudo corroboram dados previamente descritos na literatura de que a obesidade está associada a uma possível alteração da composição microbiana subgengival (ZEIGLER *et al.*, 2012). Entretanto, este é o primeiro relato sobre o aumento dos níveis de um importante patógeno periodontal e de espécies extra-orais de importância médica em uma população de adultos jovens obesos. Tendo-se em mente que quadros disbióticos são eventos que precedem o desenvolvimento de diversas doenças, assim, é possível que os eventos celulares e moleculares que ocorrem durante a obesidade, aliados a alterações na microbiota subgengival, possam acarretar em uma maior chance de desenvolvimento de doença periodontal. Desta forma, se faz necessária a orientação e o acompanhamento de indivíduos obesos quanto às medidas preventivas e terapêuticas das doenças periodontais, assim como quanto às consequências associadas à obesidade.

7 Conclusão

- Indivíduos com sobrepeso ou obesidade apresentam uma tendência a apresentarem quadro de gengivite mais frequentemente que eutróficos.
- Determinadas espécies bacterianas periodonto patogênicas, assim como espécies extra-orais, apresentam frequência e/ ou níveis significativamente mais elevados em sobrepeso e/ ou obesidade comparado a eutróficos.
- Existem associações moderadas significativas entre parâmetro indicativo de inflamação gengival, através do índice de sangramento gengival, e espécies bacterianas potencialmente patogênicas.

Referências Bibliográficas

Adamczak, M., & Wiecek, A. (2013, January). The adipose tissue as an endocrine organ. In *Seminars in nephrology* (Vol. 33, No. 1, pp. 2-13). WB Saunders.

Al-Zahrani, M. S., Bissada, N. F., & Borawski, E. A. (2003). Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *Journal of periodontology*, 74(5), 610-615.

American academy of periodontology (1999). International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontol.* v. 4, n. 1, p. 8-38.

Araújo, T. L. D., Lopes, M. V. D. O., Cavalcante, T. F., Guedes, N. G., Moreira, R. P., Chaves, E. S., & Silva, V. M. D. (2008). Analysis of risk indicators for the arterial hypertension in children and teenagers. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 42(1), 120-126.

Ardila, C. M., Perez-Valencia, A. Y., & Rendon-Osorio, W. L. (2015). *Tannerella forsythia* is associated with increased levels of atherogenic low density lipoprotein and total cholesterol in chronic periodontitis. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 7(2), e254.

Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*, 4(1), 1-6.

Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., ... & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), 15718-15723.

Bastard, J. P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., ... & Hainque, B. (2000). Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(9), 3338-3342.

Bays, H. E. (2011). Adiposopathy: is “sick fat” a cardiovascular disease?. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(25), 2461-2473.

Benguigui, C., Bongard, V., Ruidavets, J. B., Chamontin, B., Sixou, M., Ferrières, J., & Amar, J. (2010). Metabolic syndrome, insulin resistance, and periodontitis: a cross-sectional study in a middle-aged French population. *Journal of clinical periodontology*, 37(7), 601-608.

Berg, A. H., & Scherer, P. E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research*, 96(9), 939-949.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2011). SB Brasil 2010-Pesquisa nacional de saúde bucal: resultados principais.

Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R., & Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269(5223), 546.

Chaffee, B. W., & Weston, S. J. (2010). Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology*, 81(12), 1708-1724.

Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., & Waget, A. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772.

Carneiro, J; Junqueira, L. C. U. (2012). Histologia básica: texto, atlas. Guanabar-Koogan, 11^a edição.

Carranza, F. A; Newman, M. G; Takei, H. H; Klokkevold, P. R. (2007) Periodontia clínica. Guanabara Koogan, 10^a edição.

Cavalcanti, A. L., Ramos, I. A., Cardoso, A. M., Fernandes, L. H. F., Aragão, A. S., Santos, F. G., ... & Castro, R. D. (2016). Association between Periodontal Condition and Nutritional Status of Brazilian Adolescents: A Population-based Study. *Iranian journal of public health*, 45(12), 1586.

Chaffee, B. W., & Weston, S. J. (2010). Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology*, 81(12), 1708-1724.

Chastre, J., & Fagon, J. Y. (2002). Ventilator-associated pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165(7), 867-903.

Cnop, M., Havel, P. J., Utzschneider, K. M., Carr, D. B., Sinha, M. K., Boyko, E. J., ... & Kahn, S. E. (2003). Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*, 46(4), 459-469.

Colombo, A. P. V., Teles, R. P., Torres, M. C., Rosalém Jr, W., Mendes, M. C. S., Souto, R. M., & Uzeda, M. D. (2005). Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results. *Journal of periodontology*, 76(5), 778-784.

Colombo, A. V., Da Silva, C. M., Haffajee, A., & Colombo, A. P. V. (2007). Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. *Journal of periodontal research*, 42(3), 236-243.

Coppack, S. W. (2001). Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3), 349-356.

Costa, F. O., Guimarães, A. N., Cota, L. O., Pataro, A. L., Segundo, T. K., Cortelli, S. C., & Costa, J. E. (2009). Impact of different periodontitis case definitions on periodontal research. *Journal of oral science*, 51(2), 199-206.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.

Cottam, D. R., Mattar, S. G., Barinas-Mitchell, E., Eid, G., Kuller, L., Kelley, D. E., & Schauer, P. R. (2004). The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obesity surgery*, 14(5), 589-600.

D'Aiuto, F., Sabbah, W., Netuveli, G., Donos, N., Hingorani, A. D., Deanfield, J., & Tsakos, G. (2008). Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large US population-based survey. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(10), 3989-3994.

Dalla Vecchia, C. F., Susin, C., Rösing, C. K., Oppermann, R. V., & Albandar, J. M. (2005). Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *Journal of periodontology*, 76(10), 1721-1728.

Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 481-490.

da Silva-Boghossian, C. M., do Souto, R. M., Luiz, R. R., & Colombo, A. P. V. (2011). Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Archives of Oral Biology*, 56(9), 899-906.

De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., ... & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14691-14696.

de OLIVEIRA, F. J., Vieira, R. W., Coelho, O. R., Petrucci, O., de OLIVEIRA, P. P. M., Antunes, N., ... & Antunes, E. (2010). Inflamação sistêmica causada pela periodontite crônica em pacientes vítimas de ataque cardíaco isquêmico agudo. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular/Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 25(1), 51-58.

Deng, Z. L., Szafranski, S. P., Jarek, M., Bhujju, S., & Wagner-Döbler, I. (2017). Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Scientific Reports*, 7.

Després, J. P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444(7121), 881-887.

Duncan, S. H., Lopley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P., & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity*, 32(11), 1720.

DuPont, G. A. (1997). Understanding dental plaque; biofilm dynamics. *Journal of veterinary dentistry*, 14(3), 91-94.

Eckel, R. H., York, D. A., Rössner, S., Hubbard, V., Caterson, I., St Jeor, S. T., & Blair, S. N. (2004). Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: executive summary: AHA conference proceedings prevention conference VII. *Circulation*, 110, 2968-2975.

Elikowski, W., Małek-Elikowska, M., Lisicka, M., Wróblewski, D., & Fertala, N. (2017). *Eikenella corrodens* endocarditis of the tricuspid valve in an intravenous drug user. *Polski merkurusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 42(248), 81.

Esposito, K., Pontillo, A., Di Palo, C., Giugliano, G., Masella, M., Marfella, R., & Giugliano, D. (2003). Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *Jama*, 289(14), 1799-1804.

Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(5), 911-919.

Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., ... & Lechler, R. I. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 110(8), 1093-1103.

Festa, A., D'agostino, R., Howard, G., Mykkanen, L., Tracy, R. P., & Haffner, S. M. (2000). Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome. *Circulation*, 102(1), 42-47.

Flannagan, R. S., Cosío, G., & Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 355-366.

Fox, C. S., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Pou, K. M., Maurovich-Horvat, P., Liu, C. Y., ... & D'Agostino, R. B. (2007). Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments. *Circulation*, 116(1), 39-48.

Fried, S. K., Bunkin, D. A., & Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(3), 847-850.

Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770.

Genco, R. J., Grossi, S. G., Ho, A., Nishimura, F., & Murayama, Y. (2005). A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *Journal of periodontology*, 76(11-s), 2075-2084.

Girard, J., & Lafontan, M. (2008). Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes & metabolism*, 34(5), 439-445.

Godoy-Matos, A. F., Oliveira, J., Guedes, E. P., Carraro, L., Lopes, A. C., & Mancini, M. C. (2009). Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010/ABESO. *São Paulo: AC Farmacêutica*.

Goodson, J. M., Groppo, D., Halem, S., & Carpino, E. (2009). Is obesity an oral bacterial disease?. *Journal of dental research*, 88(6), 519-523.

Grundy, S. M., Brewer Jr, H. B., Cleeman, J. I., Smith Jr, S. C., & Lenfant, C. (2004). for the Conference Participants. Definition of metabolic syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 109(3), 433-438.

Haas, A. N., Wagner, M. C., Oppermann, R. V., Rösing, C. K., Albandar, J. M., & Susin, C. (2014). Risk factors for the progression of periodontal attachment loss: a 5-year population-based study in South Brazil. *Journal of clinical periodontology*, 41(3), 215-223.

Haas, A. N., Gaio, E. J., Wagner, M. C., Rios, F. S., Costa, R. D. S. A., Rösing, C. K., ... & Susin, C. (2015). A population-based cohort study of oral

health in South Brazil: The Porto Alegre Study. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 18(2), 515-519.

Haffajee, A. D., Bogren, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N. J., & Socransky, S. S. (2004). Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Journal of clinical periodontology*, 31(11), 996-1002.

Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L., & Socransky, S. S. (1998). Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *Journal of clinical periodontology*, 25(5), 346-353.

Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2009). Relation of body mass index, periodontitis and *Tannerella forsythia*. *Journal of clinical periodontology*, 36(2), 89-99.

Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*, 27(6), 409-419.

Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2016). Dancing with the stars: how choreographed bacterial interactions dictate nososymbiocity and give rise to keystone pathogens, accessory pathogens, and pathobionts. *Trends in microbiology*, 24(6), 477-489.

Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., & Cohen, S. L. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269(5223), 543.

Hall, J. E., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Wang, Z., & Hall, M. E. (2015). Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circulation research*, 116(6), 991.

Heller, D., Varela, V. M., Torres, M. C. B., Feres-Filho, E. J., & Colombo, A. P. V. (2011). Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: a 6-month RCT. *Journal of clinical periodontology*, 38(4), 355-364.

Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill–Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y. Y., ... & Wu, G. D. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137(5), 1716-1724.

Holt, S. C., & Ebersole, J. L. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000*, 38(1), 72-122.

Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., & Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2409.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2014). Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas-Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação.

Jaramillo, A., Contreras, A., Lafaurie, G. I., Duque, A., Ardila, C. M., Duarte, S., & Osorio, L. (2016). Association of metabolic syndrome and chronic periodontitis in Colombians. *Clinical Oral Investigations*, 1-8.

Kajiya, M., Giro, G., Taubman, M. A., Han, X., Mayer, M. P., & Kawai, T. (2010). Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *Journal of oral microbiology*, 2.

Kaminski, D. A., & Randall, T. D. (2010). Adaptive immunity and adipose tissue biology. *Trends in immunology*, 31(10), 384-390.

Kangas, S., Timonen, P., Knuuttila, M., Jula, A., Ylöstalo, P., & Syrjälä, A. M. H. (2017). Waist circumference and waist-to-height ratio are associated with periodontal pocketing—results of the Health 2000 Survey. *BMC Oral Health*, 17(1), 48.

Kishimoto, T. (2010). IL-6: from its discovery to clinical applications. *International immunology*, 22(5), 347-352.

Kornman, K. S., Page, R. C., & Tonetti, M. S. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*, 14(1), 33-53.

Krotkiewski, M., Björntorp, P., Sjöström, L., & Smith, U. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *Journal of Clinical Investigation*, 72(3), 1150.

Kudo, C., Shin, W. S., Minabe, M., Harai, K., Kato, K., Seino, H., ... & Pearce, Y. O. (2015). Analysis of the relationship between periodontal disease and atherosclerosis within a local clinical system: a cross-sectional observational pilot study. *Odontology*, 103(3), 314-321.

Lakka, H. M., Laaksonen, D. E., Lakka, T. A., Niskanen, L. K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., & Salonen, J. T. (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama*, 288(21), 2709-2716.

Le Sage, F., Meilhac, O., & Gonthier, M. P. (2017). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces pro-inflammatory adipokine secretion and oxidative stress by regulating Toll-like receptor-mediated signaling pathways and redox enzymes in adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*.

Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070-11075.

Li, L. W., Wong, H. M., Sun, L., Wen, Y. F., & McGrath, C. P. (2015). Anthropometric measurements and periodontal diseases in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 6(6), 828-841.

Lindhe, J. A. N., Karring, T., LANG, N. (2010). Tratado de periodontia clínica e implantodologia oral. Guanabara Koogan.

Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T. B., Flegal, K., ... & Haase, N. (2009). Heart disease and stroke statistics—2009 update. *Circulation*, 119(3), e21-e181.

Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., & Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPoseMost abundant Gene transcript 1). *Biochemical and biophysical research communications*, 221(2), 286-289.

Matsushita, K., Hamaguchi, M., Hashimoto, M., Yamazaki, M., Yamazaki, T., Asai, K., ... & Nakamura, N. (2015). The novel association between red complex of oral microbe and body mass index in healthy Japanese: a population based cross-sectional study. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 57(2), 135-139.

McLean, R. R. (2009). Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Current osteoporosis reports*, 7(4), 134-139.

Million, M., Lagier, J. C., Yahav, D., & Paul, M. (2013). Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(4), 305-313.

Mod  er, T., Blomberg, C., Wondimu, B., Lindberg, T. Y., & Marcus, C. (2011). Association between obesity and periodontal risk indicators in adolescents. *Pediatric Obesity*, 6(2Part2).

Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Hash, D. E., Burmeister, J. A., & Ranney, R. R. (1982). Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infection and Immunity*, 38(3), 1137-1148.

Morita, I., Okamoto, Y., Yoshii, S., Nakagaki, H., Mizuno, K., Sheiham, A., & Sabbah, W. (2011). Five-year incidence of periodontal disease is related to body mass index. *Journal of dental research*, 90(2), 199-202.

Nishida, N., Tanaka, M., Hayashi, N., Nagata, H., Takeshita, T., Nakayama, K., ... & Shizukuishi, S. (2005). Determination of smoking and obesity as periodontitis risks using the classification and regression tree method. *Journal of periodontology*, 76(6), 923-928.

Nisoli, E., Briscini, L., Giordano, A., Tonello, C., Wiesbrock, S. M., Uysal, K. T., ... & Hotamisligil, G. S. (2000). Tumor necrosis factor α mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 8033-8038.

Njoroge, T., Genco, R. J., Sojar, H. T., Hamada, N., & Genco, C. A. (1997). A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infection and immunity*, 65(5), 1980-1984

Page, R. C. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontal research*, 26(3), 230-242.

Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*, 14(1), 9-11.

Park, J. B., Nam, G. E., Han, K., Ko, Y., & Park, Y. G. (2016). Obesity in relation to oral health behaviors: An analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2010. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(5), 3093-3100.

Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, 42(1), 80-87.

Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., ... & Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.

Persson, G. R., Hitti, J., Paul, K., Hirschi, R., Weibel, M., Rothen, M., & Persson, R. E. (2008). *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in subgingival bacterial samples from parous women. *Journal of periodontology*, 79(3), 508-516.

Petersen, P. E., & Ogawa, H. (2005). Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *Journal of periodontology*, 76(12), 2187-2193.

Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *The Lancet*, 366(9499), 1809-1820.

Popadiak, K., Potempa, J., Riesbeck, K., & Blom, A. M. (2007). Biphasic effect of gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the human complement system. *The Journal of Immunology*, 178(11), 7242-7250.

Reeves, A. F., Rees, J. M., Schiff, M., & Hujoel, P. (2006). Total body weight and waist circumference associated with chronic periodontitis among adolescents in the United States. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 160(9), 894-899.

Ritchie, C. S. (2007). Obesity and periodontal disease. *Periodontology* 2000, 44(1), 154-163.

Ritz, H. L. (1967). Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Archives of Oral Biology*, 12(12), 1561-1568.

Sanz, M., Van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., DelleMijn-Kippuw, N., Simon, R., & Winkel, E. (2000). Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *European Journal of Oral Sciences*, 108(5), 383-392.

Saxlin, T., Ylöstalo, P., Suominen-Taipale, L., Männistö, S., & Knuuttila, M. (2011). Association between periodontal infection and obesity: results of the Health 2000 Survey. *Journal of clinical periodontology*, 38(3), 236-242.

Scorzetti, L., Marcattili, D., Pasini, M., Mattei, A., Marchetti, E., & Marzo, G. (2013). Association between obesity and periodontal disease in children. *Eur J Paediatr Dent*, 14(3), 181-4.

Sfasciotti, G. L., Marini, R., Pacifici, A., Ierardo, G., Pacifici, L., & Polimeni, A. (2016). Childhood overweight-obesity and periodontal diseases: is there a real correlation?. *Annali di stomatologia*, 7(3), 65

Soar, C., Vasconcelos, F. D. A. G. D., & Assis, M. A. A. D. (2004). Waist-hip ratio and waist circumference associated with body mass index in a study with schoolchildren. *Cadernos de Saúde Pública*, 20(6), 1609-1616.

Shimotahira, N., Oogai, Y., Kawada-Matsuo, M., Yamada, S., Fukutsuji, K., Nagano, K., ... & Komatsuzawa, H. (2013). The surface layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial coaggregation. *Infection and immunity*, 81(4), 1198-1206

Slots, J. (1977). Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *European Journal of Oral Sciences*, 85(4), 247-254.

Slots, J., & Ting, M. (1999). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontology 2000*, 20(1), 82-121.

Sochalska, M., & Potempa, J. (2017). Manipulation of Neutrophils by *Porphyromonas gingivalis* in the Development of Periodontitis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7.

Socransky, S. S., Manganiello, A. D., Propas, D., Oram, V., & Houte, J. V. (1977). Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *Journal of periodontal research*, 12(2), 90-106.

Socransky, S. S. (1977). Microbiology of periodontal disease present status and future considerations. *Journal of periodontology*, 48(9), 497-504.

Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., & Levin, A. E. (1994). "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques*, 17(4), 788-792.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, 25(2), 134-144.

Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*, 28(1), 12-55.

Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38(1), 135-187.

Souto, R., Silva-Boghossian, C. M., & Colombo, A. P. V. (2014). Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 495-501.

Souto, R., & Colombo, A. P. V. (2008). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *archives of oral biology*, 53(2), 155-160.

Susin, C., Haas, A. N., Valle, P. M., Oppermann, R. V., & Albandar, J. M. (2011). Prevalence and risk indicators for chronic periodontitis in adolescents and young adults in south Brazil. *Journal of clinical periodontology*, 38(4), 326-333.

Suvan, J., D'Aiuto, F., Moles, D. R., Petrie, A., & Donos, N. (2011). Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obesity reviews*, 12(5).

Szulc, M., Kustrzycki, W., Janczak, D., Michalowska, D., Baczynska, D., & Radwan-Oczko, M. (2015). Presence of periodontopathic bacteria DNA in atheromatous plaques from coronary and carotid arteries. *BioMed research international*, 2015.

Takeuchi, Y., Umeda, M., Sakamoto, M., Benno, Y., Huang, Y., & Ishikawa, I. (2001). *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*, 72(10), 1354-1363.

Tanner, A. C. R., Haffer, C., Bratthall, G. T., Visconti, R. A., & Socransky, S. S. (1979). A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *Journal of clinical periodontology*, 6(5), 278-307.

Tchernof, A., & Després, J. P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews*, 93(1), 359-404.

Thanakun, S., & Izumi, Y. (2016). Effect of periodontitis on adiponectin, C-reactive protein, and immunoglobulin G against *Porphyromonas gingivalis* in Thai people with overweight or obese status. *Journal of periodontology*, 87(5), 566-576.

Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*, 1(6), 6ra14-6ra14.

US Department of Health and Human Services. (2001). The Surgeon General's call to action to prevent and decrease overweight and obesity.

Wagner, V. E., & Iglewski, B. H. (2008). *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 35(3), 124-134.

Wang, Y., Lam, K. S., Yau, M. H., & Xu, A. (2008). Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochemical Journal*, 409(3), 623-633.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante Jr, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of clinical investigation*, 112(12), 1796.

Wellen, K. E., Fucho, R., Gregor, M. F., Furuhashi, M., Morgan, C., Lindstad, T., ... & Hotamisligil, G. S. (2007). Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis. *Cell*, 129(3), 537-548.

WHO, J., & World Health Organization. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WH.

World Health Organization. (1997). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation presented at the World Health Organization, June 3–5, 1997, Geneva, Switzerland. *Geneva, Switzerland: WHO*.

World Health Organization. (2000). *Obesity: preventing and managing the global epidemic* (No. 894). World Health Organization.

World Health Organization. Health Topics. Obesity: World Health Organization; 2015 [cited 2015 23/11/2015]. Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>.

Xia, M. F., Chen, Y., Lin, H. D., Ma, H., Li, X. M., Aleteng, Q., ... & Li, X. J. (2016). A indicator of visceral adipose dysfunction to evaluate metabolic health in adult Chinese. *Scientific Reports*, 6.

Ylöstalo, P., Suominen-Taipale, L., Reunanen, A., & Knuuttila, M. (2008). Association between body weight and periodontal infection. *Journal of clinical periodontology*, 35(4), 297-304.

Yudkin, J. S. (2003). Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *International Journal of Obesity*, 27(S3), S25.

Yoshii, S., Tsuboi, S., Morita, I., Takami, Y., Adachi, K., Inukai, J., ... & Nakagaki, H. (2009). Temporal association of elevated C-reactive protein and periodontal disease in men. *Journal of periodontology*, 80(5), 734-739.

Yoshimura, F., Murakami, Y., Nishikawa, K., Hasegawa, Y., & Kawaminami, S. (2009). Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of periodontal research*, 44(1), 1-12.

Zee, K. Y., Samaranayake, L. P., & Attström, R. (1996). Predominant cultivable supragingival plaque in Chinese “rapid” and “slow” plaque formers. *Journal of clinical periodontology*, 23(11), 1025-1031.

Zeigler, C. C., Persson, G. R., Wondimu, B., Marcus, C., Sobko, T., & Modéer, T. (2012). Microbiota in the oral subgingival biofilm is associated with obesity in adolescence. *Obesity*, 20(1), 157-164.

Zeyda, M., Farmer, D., Todoric, J., Aszmann, O., Speiser, M., Györi, G., ... & Stulnig, T. M. (2007). Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *International journal of obesity*, 31(9), 1420.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil microbiano do biofilme dental e saúde bucal em adultos jovens e sua associação com obesidade e risco cardiovascular

Pesquisador: DANIELLE RODRIGUES DE ANDRADE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54543816.8.0000.5283

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.500.927

Apresentação do Projeto:

As doenças bucais são causadas pela presença de biofilme dental patogênico, que desencadeia uma resposta inflamatória local com repercussão sistêmica. Em outra vertente, a obesidade é um estado crônico associado a distúrbios comportamentais, metabólicos, imunológicos e cardiovasculares que pode modificar a resposta a patógenos periodontais. A população de estudo será constituída por 90 alunos e/ou funcionários da Unigranrio, Campus I. Serão incluídos indivíduos com idades entre 18 e 30 anos com pelo menos 20 dentes. Os indivíduos responderão a questionários anamnésicos; serão examinados quanto à saúde odontológica; terão suas medidas antropométricas mensuradas; terão sua pressão arterial sistêmica aferida; além de serem submetidos à coleta de biofilme dental e de sangue periférico. Será determinada a prevalência, a extensão e a gravidade das doenças bucais encontradas. Os indivíduos serão categorizados conforme suas medidas antropométricas em eutróficos, com sobrepeso ou obesos. Amostras de biofilme subgengival serão coletadas e analisadas quanto ao perfil bacteriano através do método do checkerboard DNA-DNA hybridization. O sangue periférico será submetido a processamento bioquímico (glicemia e lipidograma). Diferenças significativas para as variáveis serão testadas através dos testes Qui-quadrado, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Associações entre os parâmetros clínicos, sorológicos e as frequências e os níveis bacterianos serão testadas através do

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.500.927

Coefficiente de Correlação de Spearman e de modelos de regressão linear múltipla, ajustando para as covariáveis. O nível de significância a ser utilizado será 5%.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do projeto é avaliar a saúde bucal, os níveis de bactérias periodonto patogênicas em adultos jovens, investigando a associação destes parâmetros com a ocorrência de sobrepeso/ obesidade e risco cardiovascular. Além disto, serão estudadas possíveis associações entre a ocorrência de doença periodontal, alterações da pressão arterial e outros marcadores de risco para doença cardiovascular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos envolvidos são mínimos, pois o estudo é observacional, no qual serão seguidas todas as normas de biossegurança no exame clínico de pacientes.

Benefícios:

Os indivíduos terão diagnóstico de sua condição de saúde bucal, assim como de seu risco cardiovascular. Desta forma, serão orientados de acordo com as necessidades preventivas e terapêuticas identificadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante e como cita a pesquisadora "[...]com vistas da necessidade por maiores esclarecimentos sobre a associação entre doença periodontal, obesidade e outras doenças cardiometabólicas, assim como o impacto na qualidade de vida e elevados índices de mortalidade associados à obesidade e doenças cardiovasculares, este estudo tem como objetivo avaliar a saúde bucal, os níveis de bactérias periodonto patogênicas em adultos jovens, e investigar a associação destes parâmetros com a ocorrência de sobrepeso/ obesidade e risco cardiovascular."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados como determina a Resolução 466 do CNS de 12/12/2012.

Recomendações:

Recomendo que os resultados da pesquisa, favoráveis ou não, sejam divulgados em eventos científicos e publicações na forma de artigos e textos em revista indexadas pelo Qualis

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

**UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO**



Continuação do Parecer: 1.500.927

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa apresenta relevância científica e atende aos requisitos da Resolução 466 do CNS de 12/12/2012.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO atendendo o previsto na Resolução 466/12 do CNS/MS APROVOU o referido projeto na reunião ocorrida em 14 de abril de 2016. Caso o (a) pesquisador (a) altere a pesquisa é necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Cordialmente,
CEP/Unigranrio.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_677963.pdf	16/03/2016 18:19:37		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	16/03/2016 18:14:52	DANIELLE RODRIGUES DE ANDRADE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Dani.docx	16/03/2016 18:14:36	DANIELLE RODRIGUES DE ANDRADE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	14/03/2016 23:19:04	DANIELLE RODRIGUES DE ANDRADE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia.pdf	14/03/2016 23:17:51	DANIELLE RODRIGUES DE ANDRADE	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	14/03/2016 23:17:33	DANIELLE RODRIGUES DE ANDRADE	Aceito
Outros	ficha_anamnese.docx	14/03/2016	DANIELLE	Aceito

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.500.927

Outros	ficha_anamnese.docx	23:00:05	RODRIGUES DE ANDRADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_Danielle.doc	14/03/2016 22:58:18	DANIELLE RODRIGUES DE ANDRADE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DUQUE DE CAXIAS, 14 de Abril de 2016

Assinado por:

Renato Cerqueira Zambrotti
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“Perfil microbiano do biofilme dental e saúde bucal em adultos jovens e sua associação com obesidade e risco cardiovascular”**. Você foi selecionado por ordem de chegada e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição (Unigranrio).

Os objetivos deste estudo são estudar as associações entre o exame clínico das gengivas, sua massa corporal (peso), pressão sanguínea arterial, dados de exame de sangue e a identificação dos níveis de bactérias causadoras de doenças gengivais.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder a um questionário sobre dados pessoais e de saúde geral e bucal, ser examinado pelo dentista (gengivas e dentes), fornecer amostras de sangue e de placa bacteriana dental, ser pesado e medido (altura e circunferência da cintura e do quadril).

Os riscos relacionados com sua participação são mínimos.

Os benefícios relacionados com a sua participação um melhor conhecimento do seu estado de saúde bucal e geral e encaminhamento para tratamento das necessidades encontradas.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os resultados de seus exames serão confidenciais, ou seja, somente o pesquisador terá acesso a suas informações e serão utilizados somente para o objetivo do presente estudo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com a pesquisadora responsável Danielle Rodrigues de Andrade no telefone 969667418 ou no email danielle.r.andrade@hotmail.com ou com Carina Maciel da Silva Boghossian no e-mail carinabogho@unigranrio.edu.br ou no telefone 26727776.

Pesquisador Responsável: Danielle Rodrigues de Andrade

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733 – ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20____.

Sujeito da pesquisa

Pai / Mãe ou Responsável Legal (Caso o sujeito seja menor de idade)

PROJETO DE PESQUISA - FICHA DE ANAMNESE

Nome: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Telefone: _____ Estado civil: _____ Profissão: _____

Sua cor ou raça é: () 1 - Branca () 2 - Preta () 3 - Amarela () 4 - Parda () 5 - Indígena

Sua renda familiar é: () 1. Menor de 1 salário mínimo () 2. de 1 salário mínimo () 3. de 1 a 2 salários mínimos

() 4. de 2 a 3 salários mínimos () 5. mais de 3 salários mínimos

Nível de escolaridade: Sabe ler e escrever? () Sim () Não

Qual é o curso mais elevado que cursou, no qual concluiu pelo menos uma série? _____

Questionário Médico

1. Nome do seu médico: _____ Telefone: _____

2. Data do último exame médico: _____

3. Você já foi hospitalizado(a)? () Sim () Não () Não sei

4. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

5. Você está sob cuidados médicos? () Sim () Não () Não sei

6. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

7. Você tem ou já teve alguma das seguintes condições:

8. Doenças congênitas do coração? () Sim () Não () Não sei

9. Doenças cardíacas (ex.: enfarte, angina, derrame, pressão alta, pressão baixa)? () Sim () Não () Não sei

10. Respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço? () Sim () Não () Não sei

11. Inchaço nos pés ou nos tornozelos? () Sim () Não () Não sei

12. Dor, pressão ou mal estar no peito? () Sim () Não () Não sei

13. Febre reumática? () Sim () Não () Não sei

14. Endocardite bacteriana? () Sim () Não () Não sei

15. Sopro no coração? () Sim () Não () Não sei

16. Desmaios convulsões ou epilepsia? () Sim () Não () Não sei

17. Dor de cabeça freqüente (2 ou mais por semana)? () Sim () Não () Não sei

18. Tratamento nervoso? () Sim () Não () Não sei

- 19.Problemas pulmonares (ex.: tuberculose, asma, enfisema, bronquite)? () Sim () Não () Não sei
- 20.Hepatite, doenças hepáticas, icterícia? () Sim () Não () Não sei
- 21.Artrite ou dores articulares? () Sim () Não () Não sei
- 22.Doenças sexualmente transmissíveis (ex.: sífilis, gonorréia, AIDS)? () Sim () Não () Não sei
- 23.Diabetes? () Sim () Não () Não sei
- 24.Demora na cicatrização dos ferimentos? () Sim () Não () Não sei
- 25.Você urina mais de seis vezes por dia? () Sim () Não () Não sei
- 26.Você sente sede a maior parte do tempo? () Sim () Não () Não sei
- 27.Problemas sangüíneos (ex.: anemia, fragilidade capilar, coagulação, sangramento, hemoptise, melena, hematemesa, hemotúria, epistaxes)? () Sim () Não () Não sei
- 28.Úlceras ou outros problemas estomacais? () Sim () Não () Não sei
- 29.Reação alérgica a: anestésicos, antibióticos (ex.: penicilina, tetraciclina), sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranqüilizantes, outros (ex.: alimentos, iodo, poeira)? () Sim () Não () Não sei
- 30.Você já sofreu transfusão sangüínea? () Sim () Não () Não sei
- 31.Você está tomando algum medicamento (listar nas observações)? () Sim () Não () Não sei
- 32.Você teve um aumento ou diminuição acentuada do peso? () Sim () Não () Não sei
- 33.Você teve uma variação recente no apetite? () Sim () Não () Não sei
- 34.Você sofreu tratamento com raios x, rádio ou cobalto? () Sim () Não () Não sei
- Somente para mulheres
- 35.Você já passou pela menopausa? () Sim () Não () Não sei
- 36.Você está tomando algum hormônio? () Sim () Não () Não sei

Questionário Odontológico

- 1.Nome do seu dentista:_____ Telefone:_____
- 2.Freqüência de visitas ao dentista:_____
- 3.Data da última visita ao dentista:_____
- História das extrações:
- 4.Causa provável das extrações:_____
- 5.Data da última extração:_____

6. Você teve reações adversas durante ou após alguma extração dentária? () Sim () Não () Não sei
7. Você teve sangramento excessivo após alguma extração dentária? () Sim () Não () Não sei
8. Suas gengivas sangram? () Sim () Não () Não sei
9. Você já teve algum abscesso periodontal ou GUNA? () Sim () Não () Não sei
10. Você já fez algum tratamento periodontal? () Sim () Não () Não sei
11. Em caso de resposta positiva, qual, quando? _____
12. Você já teve algum tratamento ortodôntico? () Sim () Não () Não sei
13. Em caso de resposta positiva, listar data do tratamento, condição tratada, e tempo de duração do tratamento:

14. Você já fez algum tratamento de canal? () Sim () Não () Não sei
15. Em caso de resposta positiva, data do tratamento de canal: _____
16. Você usa ou já usou alguma prótese dentária? () Sim () Não () Não sei
17. Em caso de resposta positiva, citar idade da prótese em uso: _____
18. História dentária familiar:
- a) Alguém em sua família tem ou teve doença periodontal? () Sim () Não () Não sei
- b) Alguém em sua família teve perda precoce dos dentes? () Sim () Não () Não sei
- c) Em caso de resposta positiva, listar quem e possíveis causas: _____
19. Você costuma respirar pela boca? () Sim () Não () Não sei
20. Você range os dentes? () Sim () Não () Não sei
21. Quantas vezes você escova os dentes por dia? _____
22. Alguém já lhe ensinou a escovar os dentes? () Sim () Não () Não sei
23. Você usa fio dental? () Sim () Não () Não sei
24. Você está usando ou já usou algum medicamento para tratar de problemas dentários?
() Sim () Não () Não sei
25. Em caso de resposta positiva, que medicamento, quando usou e condição que levou ao uso:

26.Você fuma?

() Sim () Não

27.Em caso de resposta positiva, quantos cigarros por dia, há quanto tempo? _____

28.Caso você seja ex-fumante, há quanto tempo parou, por quanto tempo fumou, e quantos cigarros costumava fumar?

Assinatura

____/____/____

Data

Nome: _____

Idade: _____

Data: __/__/__

17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D
17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D
17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D
17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D
17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	D P M	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D	M P D
47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37
D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	D V M	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D	M V D
D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	D L M	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D	M L D

CPOD: 17____ 16____ 15____ 14____ 13____ 12____ 11____ 21____ 22____ 23____ 24____ 25____ 26____
 27____ 37____ 36____ 35____ 34____ 33____ 32____ 31____ 41____ 42____ 43____ 44____ 45____ 46____
 47____

Dentes com amostras coletadas: _____