



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIAGNÓSTICO
GENÉTICO E MOLECULAR

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE CITOMEGALOVÍRUS
HUMANO, BACTÉRIAS TOTAIS E BETA GLOBINA EM PACIENTES COM IMPLANTES
DENTÁRIOS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Diagnóstico Genético e Molecular da
Universidade Luterana do Brasil,
para obtenção do Título de Mestre
em Diagnóstico Genético e Molecular

Ediulson Ilo Lisbôa
Orientador: Dr. Nilo Ikuta
Co-orientadora: Dr^a. Sabrina Carvalho Gomes

Canoas, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao orientador deste trabalho, prof. Dr. Nilo Ikuta.

À prof^a. Dra. Sabrina Carvalho Gomes.

À minha família pelo apoio constante e incentivo.

À minha esposa Lilian e minha filha Ana Luiza pelo carinho e apoio.

À amiga Isabel de Mattos Milmann pelo ajuda valiosa.

Aos membros da banca examinadora.

Aos professores deste curso de Pós-Graduação.

Aos colegas de aula.

Aos alunos e Professores da Odontologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE.

À Universidade Luterana do Brasil

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. JUSTIFICATIVA.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
6. CONCLUSÕES.....	22
7. PERSPECTIVAS.....	23
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre a presença de citomegalovírus (CMV), bactérias totais e beta globina com a gravidade da doença periodontal e perimplantar humana. A detecção molecular, através da técnica de PCR em tempo real, não identificou o CMV, enquanto as bactérias totais e beta globina estavam presentes em todos os sítios estudados. Foram investigadas as diferenças das concentrações de bactérias totais e beta globina entre os sítios coletados de *i)* dentes e implantes, *ii)* dentes/implantes saudáveis e doentes, *iii)* perda de inserção 0-3 e 4-5 e *iv)* profundidade de sondagem. Não foram encontradas diferenças significativas entre as quantidades de bactérias totais em nenhum dos parâmetros estudados. A quantidade de beta globina, por sua vez, foi significativamente maior em dentes e implantes doentes e nos sítios com maior profundidade de sondagem. Além disto, a beta globina humana demonstrou-se um bom marcador de viabilidade das amostras, conferindo confiabilidade nas detecções CMV negativas, além da sua quantificação mostrar-se um novo e potencial marcador a ser avaliado no diagnóstico e monitoramento da doença periodontal e perimplantar.

PALAVRAS CHAVES: PCR, periodontite, CMV, bactérias totais, betaglobina.

ABSTRACT

The purpose of this work was to investigate the relationship between the presence of DNA of cytomegalovirus (CMV), total bacteria and beta globin with severity of human periodontal and perimplantar diseases. The CMV was not detected by real time PCR, while total bacteria and beta globin were present in all studied sites. We investigated the differences in total bacteria and beta globin concentrations between sites collected from i) teeth and implants, ii) teeth / implants from healthy and seek sites, iii) clinical attachment loss 0 - 3 and 4 - 5 iv) probing depth. No significant differences were found between amount of total bacteria in any of the studied parameters. The amount of beta globin was significantly higher in sites from seek teeth/implants and in sites with greater probing depth. Moreover, the human beta globin showed to be a good sample viability control, giving confidence in negative CMV results. Beta globin quantifation display is a new potential marker to be evaluated in the diagnosis and monitoring of periodontal and perimplantar disease.

KEY WORDS: PCR, periodontitis, CMV, total bacteria, betaglobina.

1- INTRODUÇÃO

O controle da infecção periodontal prévio e pós colocação de implantes está entre as principais variáveis relacionadas ao sucesso dos implantes dentários (Lutercacher *et al.*, 2000, Wennstrom *et al.*, 2004). De acordo com a literatura, pacientes que mantêm excelente controle dos biofilmes, supra e subgingival, aumentam a probabilidade de sucesso de implantes (Zitzmann *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2006). Além disso, existem evidências que a colocação de implantes em pacientes com histórico de doença periodontal destrutiva pode conferir risco aumentado de falha do mesmo ao longo dos anos (Hardt *et al.*, 2002; Karoussis *et al.*, 2003). Sugere-se que a perda de implantes se dê em decorrência da perimplantite, processo inflamatório que determina a perda óssea perimplantar (Salvi & Lang, 2004), levando à instalação de seqüelas, muitas vezes, irreversíveis. A perimplantite, assim como a periodontite, são processos inflamatórios, modulados pelo hospedeiro, mais ou menos suscetível (Romeo *et al.*, 2004).

Os métodos de diagnóstico molecular têm auxiliado no conhecimento da microbiota envolvida nas patologias orais, principalmente nos casos de agentes de difícil cultivo *in vitro*. Dentre as técnicas moleculares utilizadas, a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) tem sido amplamente utilizada para detectar e quantificar patógenos bacterianos (Holland *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2003) e virais (Razonable *et al.*, 2000a; Razonable *et al.*, 2002b; Boom *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003). Através desta técnica já foi demonstrada a relação entre a presença do CMV e a periodontite severa do adulto, periodontite juvenil, gengivite ulcerativa necrosante aguda e abscessos periodontais (Slots, 2004; Kamma *et al.* 2001).

Uma prática usual para verificar a viabilidade de uma amostra clínica é a amplificação de um controle de qualidade de coleta. Como exemplo, podemos citar a amplificação da betaglobina humana para detecção de Papilomavírus

Humano (Fakhry *et al.*, 2006; Smith *et al.* 2007). Somente as amostras betaglobina positivas são consideradas válidas para análise, o que reduz a ocorrência de resultados falsos negativos. Estes podem estar relacionados com uma coleta inadequada, degradação da amostra ou presença de inibidores de amplificação.

Além disso, a betaglobina tem sido utilizada como alternativa para diagnóstico não invasivo em patologias como traumatismo craniano (Lo *et al.*, 1998; Yurgel *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2000; Lam *et al.* 2003) e derrame cerebral (Rainer *et al.*, 2003). Esses estudos procuraram estabelecer o nível de DNA circulante como indicador de severidade clínica. Foi sugerido que o DNA presente no plasma ou soro é um potencial marcador prognóstico, já que foi demonstrada correlação entre os níveis de DNA e a gravidade das lesões, assim como com o desenvolvimento de complicações pós-traumáticas.

As doenças periodontais estão intimamente relacionadas a bactérias que estão presentes na cavidade bucal. Estas podem ser detectadas na saliva, líquido do sulco gengival, placa bacteriana e em condições específicas podem ocasionar as doenças dos tecidos moles e, posteriormente dos elementos de suporte dos elementos dentais e de implantes (Nualart-Grollmus, 2007).

A microbiota na dentição natural em sulco periodontal e sulco perimplantar é muito semelhante, tanto na saúde como na doença. Em saúde predominam os cocos e na doença predominam bactérias Gram-negativos (Meffert,1996). Takanashi *et al.* (2004) investigaram a colonização de bactérias anaeróbias em dentes naturais e implantes pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os autores analisaram a presença das bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, e demonstraram que um mês após a conexão do *abutment* (intermediário, pilar, transmucoso), *P. Gingivalis* foi detectado ao redor do implante em 63,7% dos casos e a *P. intermedia* com 50,8%. Seis meses depois, *P. gingivalis* foi detectado em 56,8% dos casos e a *P. intermedia* em 41,1%. O padrão de colonização nos dentes naturais foi semelhante em 75% dos casos analisados.

O citomegalovírus humano (CMV), formalmente designado como herpesvírus 5 (HHV-5) pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICVT), é um membro da família *Herpesviridae*, onde fazem parte o herpesvírus simples tipo 1 e 2 (HHV-1, HHV-2), vírus da Varicella-Zoster (HHV-3), vírus Epstein-Barr (HHV-4), herpesvírus 6, 7 e 8 (HHV-6, HHV-7, HHV-8) (HODINKA, 2007).

A prevalência do CMV na população mundial é extremamente elevada, podendo variar de 40% a 90% (Van Der Bij & Speich, 2001). O vírus não é altamente contagioso, sendo contraído através do contato pessoal próximo com indivíduos que excretam o vírus em seus fluidos corporais como: saliva, urina, sangue, leite e sêmen (Taylor, 2003). Similar à infecção com outros vírus na família *Herpesviridae*, o CMV pode se manter de forma latente, devido à sua capacidade de permanecer associado às células do hospedeiro (Criscuoli et al., 2006). A reativação subsequente pode ocorrer em resposta a diversos estímulos, tais como o uso de imunossupressores ou quimioterapia, entre outros (Crumpacker, 2005).

O CMV tem tropismo por glândulas salivares (Britt & Alford, 1996) e vários estudos têm demonstrado a sua correlação com doenças periodontais (Contreras & Slots, 1996; Saygun et al., 2002; Yapar et al., 2003). A infecção ativa no periodonto danifica defesas locais favorecendo a proliferação de bactérias patogênicas periodontais como *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. Sugere-se que a associação entre o vírus da herpes e bactérias constituem uma característica patogênica importante da periodontite e também de infecções não orais (Slots, 2007).

2- JUSTIFICATIVA

Com o advento da Implantodontia, novos desafios foram impostos no que se refere ao planejamento implantar, sobretudo no diagnóstico das condições de saúde-doença periimplantares. A perimplantite, é uma doença infecto-inflamatória, sendo uma das principais causas de perda de implantes. Neste sentido, o entendimento da composição da microbiota nestes sítios pode ser importante para a compreensão dos fatores envolvidos no desenvolvimento da mesma.

O CMV, conhecido agente imunossupressor que favorece a multiplicação de patógenos periodontais, tem sido descrito nos sítios com doença periodontal. Uma vez que a microbiota bacteriana associada a sítios periodontais e periimplantares saudáveis ou doentes é semelhante, o presente estudo visa investigar a incidência deste agente viral em sítios periodontais e periimplantares.

Técnicas de Biologia Molecular têm sido cada vez mais utilizadas na identificação de agentes etiológicos. Uma vez que estas técnicas prescindam de cultivo dos agentes marcadores, é essencial certificar-se da viabilidade das amostras. Este estudo, visa analisar a eficiência da detecção e/ou quantificação da beta-globina para este fim.

3- OBJETIVOS

- Comparação da presença do CMV e dos níveis de bactérias totais e beta globina em lesões periodontais e perimplantares em pacientes edentados parciais.
- Correlação da concentração de beta globina, bactérias totais e CMV e da gravidade da doença entre sítios periodontais e perimplantares.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos: O projeto teve aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Luterana do Brasil. A seleção dos pacientes, caracterização clínica e coleta das amostras foram realizadas por Milman (2008).

Pacientes e amostras controle: Foram selecionados 16 pacientes atendidos nos Cursos de Especialização e Mestrado das áreas de Periodontia, Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Prótese, da Universidade Luterana do Brasil de Canoas – RS. Os pacientes selecionados apresentam as seguintes características:

- ✓ idade média: $51,5 \pm 8,7$ anos;
- ✓ gênero feminino: 62,5%;
- ✓ 1 paciente diabético;
- ✓ 2 fumantes.

Dos indivíduos avaliados, 9 possuíam implantes Nobel Biocare (Brånemark System® ou Nobel Replace™, Suécia) e 7 ITI (Straumann® Dental Implant System, Suíça), totalizando 31 implantes nos 16 pacientes (distribuídos conforme Tabela 1). O número médio de implantes por indivíduo foi variável ($1,94 \pm 1,73$) e o tempo médio na boca foi de $5,06 \pm 2,21$ anos.

Tabela 1 – Distribuição dos implantes por região.

DENTE	SUPERIOR	INFERIOR
Incisivos	4	2
Caninos	2	0
Pré-molares	4	3
Molares	4	12
TOTAL	14	17

Seleção dos sítios experimentais para coleta: A partir do exame físico periodontal e perimplantar, 4 sítios em cada paciente foram selecionados para

coleta. Esta seleção foi realizada de forma aleatória, respeitando cada um dos seguintes critérios:

1. Periodontal saudável: ausência de sangramento marginal e subgengival.
2. Perimplantar saudável: ausência de sangramento marginal e subgengival.
3. Periodontal doente: presença de sangramento subgengival com ou sem sangramento marginal.
4. Perimplantar doente: presença de sangramento subgengival com ou sem sangramento marginal.

Coleta das amostras: Uma semana após a realização do exame clínico, foi realizada a coleta. Inicialmente foi feita a remoção do biofilme supragengival, seguida por lavagem leve, secagem e isolamento relativo do campo. Logo após, foi realizada a coleta da amostra em dentes e em implantes, com cone de papel absorvente estéril nº 30 (marca EndoPoint, Paraíba do Sul, RJ). Após o cone foi devidamente armazenado, em tubos plásticos com capacidade de 1,5ml, a -20° C, e posteriormente analisado.

Testes moleculares: Os testes foram baseados na utilização de PCR em tempo real (qPCR).

- Extração de DNA - Foi realizada através do protocolo de adsorção em sílica (BOOM, *et al.*, 1990). O método é baseado nas propriedades de lise e inativação de nucleases pelo tiocianato de guanidina (GuSCN) que em altas concentrações possui a propriedade de adsorver ácidos nucléicos em partículas de sílica. O DNA retido nas partículas de sílica pode ser rapidamente sedimentado por centrifugação, lavados e posteriormente eluídos em solução tampão de baixa salinidade.
- qPCR - Amplificação do DNA - O DNA purificado foi amplificado no equipamento Applied Biosystem SDS 7000. A amplificação e detecção é baseada no sistema *Taqman* (HOLLAND, *et al.*, 1991).

- Primers e Sondas: A Tabela 2 apresenta os primers e sondas utilizados. As condições de amplificação foram as mesmas descritas pelos autores.

Análise Estatística: A análise estatística utilizou os sítios de coleta como unidade de análise. Os dados obtidos foram analisados e avaliados através dos testes Tukey e testes não paramétricos de Mann-Whitney e Correlação de Spearman. O nível de significância estabelecido para estas análises foi de $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico SPSS, versão 11.5.

Tabela 2. Primers e sondas utilizados no trabalho.

Alvo	Primers (5' -3')	Sondas (5' FAM – 3' TAMRA)	Referência
CMV	UL55F: TGGGCGAGGACAACGAA	UL55P: TGGGCAACCACCGCACTGAGG	Boeckh <i>et al.</i> 2004
	UL55R: TAGGGCTGGGAAGCTGACAT		
	UL123F: TCCCGCTTATCCTCRGGTACA	UL123P: TCTCATACATGCTCTGCATAGTTAGCCCAATACA	
	UL123R: TGAGCCTTTCGAGGASATGAA		
beta globina	beta-globin354F: GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA	beta-globinP: AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG	Yurgel <i>et al.</i> 2007
	beta-globin455R:CCTTGATACCAACCTGCCAG		
bactérias totais	UniversalF: TCCTACGGGAGGCAGCAGT	UniversalIP: CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	Kuboniwa <i>et al.</i> , 2004
	UniversalR:GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho analisa a presença de bactérias totais, beta globina e Citomegalovírus (CMV) humano em amostras coletadas a partir de sítios perimplantares e periodontais sadios e doentes. A coleta das amostras e a caracterização clínica foram realizadas na dissertação de mestrado de Milmann (2008). A autora analisou a condição periodontal e perimplantar de 16 pacientes parcialmente edentados, demonstrando que os achados físicos periodontais e perimplantares eram similares. A análise estatística realizada pela autora, demonstrou que os sítios implantares apresentaram maior profundidade de sondagem que os sítios periodontais, mesmo quando não acompanhadas por sangramento.

Para a execução do presente estudo, foi realizada a implementação da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para detecção e quantificação de bactérias totais, previamente às análises das amostras clínicas. As amplificações do DNA do CMV e beta globina humana já estavam implementadas e utilizadas rotineiramente em nosso laboratório para análise de amostras de plasma e sangue total e testadas neste trabalho na análise de amostras bucais.

Numa segunda etapa, foram analisadas as 64 amostras de todos os pacientes analisados por Milman (2008), e na Tabela 3 estão sumarizadas as características e as quantidades de beta globina e bactérias totais. A beta globina e bactérias totais foram detectadas em todas as amostras analisadas. O log do n° de beta globina variou de 4,5 – 7,1 por sítio, enquanto que a bactérias totais variou de 2,6 – 7,4 por sítio. Foi realizada também a detecção e quantificação de Citomegalovírus em todos os sítios estudados, e o vírus não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas.

Tabela 3: Caracterização dos sítios coletados quanto à profundidade de sondagem (PS), perda de inserção (PI), condição periodontal e periimplantar, log do n° de cópias de beta globina e bactérias totais/ sítio.

Paciente	Dentes					Implantes				
	PS	PI	Condição periodontal	Beta globina	Bact. Totais	PS	PI	Condição periimplantar	Beta globina	Bact. Totais
1	3	2	saudável	5,4	5,9	3	0	saudável	5,8	6,2
1	4	3	saudável	5,6	5,4	3	0	saudável	5,2	4,6
2	4	2	saudável	6,6	5,6	3	3	saudável	6,0	4,7
2	5	5	saudável	6,2	3,8	5	5	saudável	5,8	4,4
3	3	1	saudável	5,6	5,8	3	0	saudável	6,2	5,8
3	5	2	saudável	5,9	5,9	5	3	saudável	6,5	5,8
4	4	2	doente	6,3	5,6	4	0	saudável	6,8	5,8
4	3	3	saudável	5,8	4,7	4	0	saudável	6,5	4,5
5	4	3	doente	6,5	6,4	3	0	saudável	6,4	5,9
5	4	4	saudável	6,0	6,7	4	0	doente	6,3	6,1
6	3	0	saudável	5,2	5,5	8	0	saudável	4,5	5,5
6	3	0	saudável	5,9	5,2	2	3	saudável	5,8	6,2
7	5	2	doente	6,4	7,1	4	0	saudável	6,3	3,9
7	4	4	saudável	6,4	6,0	5	0	saudável	6,7	5,3
8	3	2	doente	6,5	6,5	5	0	doente	6,3	4,3
8	4	2	saudável	6,5	6,0	5	0	saudável	6,1	5,6
9	3	2	saudável	6,2	6,6	5	0	saudável	7,0	5,8
9	3	2	saudável	6,7	6,9	5	0	saudável	6,8	4,7
10	3	0	doente	6,0	5,3	5	0	doente	6,8	5,1
10	3	0	saudável	5,7	3,9	5	0	saudável	6,3	5,9
11	3	1	doente	6,7	6,0	5	1	doente	6,9	5,6
11	4	4	doente	6,8	6,5	5	2	doente	6,9	3,6
12	5	1	doente	6,3	2,6	4	4	doente	7,1	5,4
12	5	7	saudável	6,5	5,9	7	7	saudável	6,1	7,1
13	2	0	doente	5,7	5,6	3	0	doente	6,5	6,5
13	3	2	doente	6,5	7,4	4	0	doente	6,3	4,6
14	4	5	doente	6,5	4,7	4	0	saudável	6,5	5,3
14	6	7	saudável	6,6	6,9	5	0	doente	6,1	5,6
15	3	1	saudável	6,2	6,0	5	0	doente	6,6	6,9
15	4	3	doente	6,0	3,3	6	0	saudável	6,7	4,1
16	3	2	saudável	6,6	5,7	3	0	saudável	6,4	4,7
16	3	3	saudável	5,6	5,6	4	0	saudável	6,0	4,6

Verificou-se que nos artigos onde está descrita a análise molecular de patógenos bucais, não são utilizados controles como a beta globina (gene humano) para validação de resultados negativos como em Kuboniwa et al. 2004 e Kasuga et al., 2000. Este procedimento é usado em outras áreas, como por

exemplo, nas análises de detecção por PCR de Papilomavírus Humano (HPV). Nestes casos, é frequente uma amostra estar inviável para análise devido a uma coleta inadequada (amostra insuficiente, presença de inibidores) ou pela degradação pós coleta (má conservação, transporte inadequado). Nestes casos, um resultado é considerado HPV negativo somente quando se detecta a beta globina nas mesmas amostras extraídas (Fakhry *et al.*, 2006; Smith *et al.* 2007). A detecção de beta globina do presente estudo, determinou que todas as amostras eram viáveis para a análise molecular, indicando que as mesmas não apresentam problemas de coleta, inibidores de qPCR ou degradação de DNA.

Por outro lado, nos trabalhos de detecção e quantificação de patógenos bucais é frequente a detecção e quantificação paralela de bactérias totais (Takanashi *et al.*, 2004; Kuboniwa *et al.*, 2004). Estes resultados podem ser utilizados semelhantemente aos obtidos pela beta globina, validando um resultado negativo. Esta análise é possível, pois todo o indivíduo independente da saúde bucal possui uma alta população bacteriana na cavidade bucal. Este dado foi confirmado em nosso estudo, onde a qPCR detectou bactérias totais em todas as amostras analisadas. Nonnenmacher *et al.* (2004) descrevem sobre a utilização de um controle para monitorar possíveis falsos negativos decorrentes de uma inibição de amplificação. Este é realizado, através da adição de um DNA do patógeno que está sendo analisado, nas amostras com resultado prévio negativo. Assim, a não amplificação indica a presença de inibidores na PCR. Este ensaio é menos informativo que a análise de bactérias totais ou beta globina, pois não pode ser utilizado para monitorar a degradação ou falta de amostra durante a coleta.

Apesar de todas as amostras do presente estudo serem consideradas viáveis para análise (detecção de beta globina e bactérias totais), causou-nos inicialmente uma certa estranheza a não detecção de CMV nas amostras de nosso trabalho, onde todos os pacientes eram portadores de doença periodontal crônica. Há vários achados na literatura como o descrito por Contreras *et al.* (1999), que analisaram pacientes com doença periodontal severa (30 pacientes), moderada (38), leve (31) e com gengivite (41), detectando o CMV

respectivamente em 33%, 24%, 9% e 10%. O CMV foi mais frequentemente detectado nos sítios de doença ativa em periodontite agressiva (94% - Kamma *et al.* 2001) e periodontite juvenil localizada (73% - Ting *et al.*, 2000; Michalowicz *et al.*, 2000). Estes últimos autores analisaram também 65 pacientes sem doença periodontal, detectando CMV em 21% destas amostras. Uma das diferenças de nosso trabalho com estas altas prevalências citadas na literatura, está no método de amplificação: nos artigos descritos, utilizou-se a técnica de *nested* PCR (PCR aninhado) enquanto nosso trabalho utilizou-se a técnica de qPCR (*real time* PCR - amplificação única). Esta diferença de sensibilidade foi recentemente descrita por Botero *et al.* (2008), onde foram comparadas as duas técnicas em 44 pacientes com doença periodontal e 24 pacientes sem doença periodontal. No primeiro grupo, a *nested* PCR detectou 79,5%, enquanto a qPCR detectou 47,7%; no grupo controle a *nested* PCR detectou 25%, enquanto a real time PCR 4,1% (1 amostra). A diferença de sensibilidade das técnicas, segundo o autor, está no número de ciclos de amplificação entre as duas técnicas (70 ciclos - *nested* PCR x 45 ciclos - qPCR), sugerindo que a *nested* PCR pode estar detectando os casos de infecção ativa e infecção latente, e a qPCR os casos de infecção ativa nos sítios com periodontite.

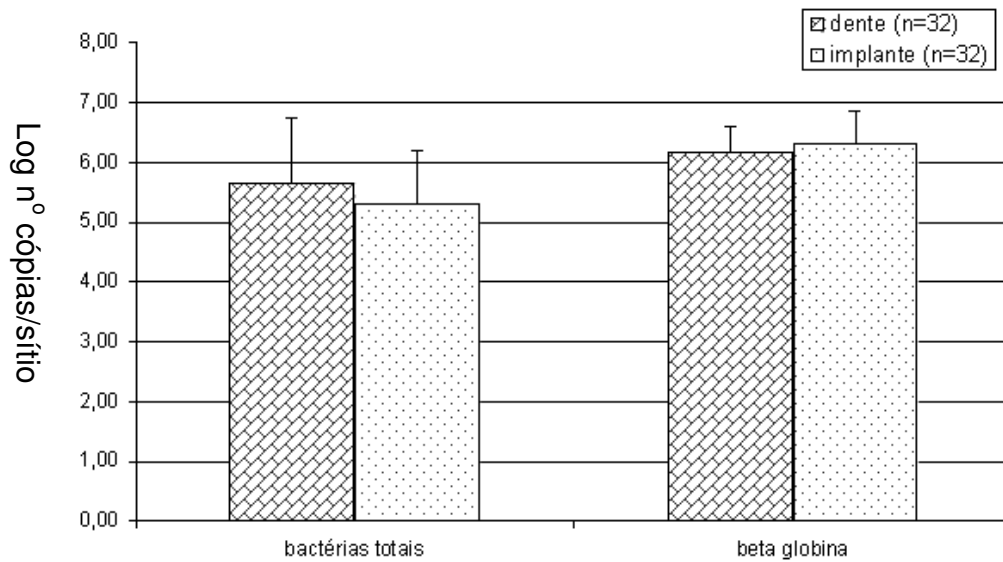
Analisando outros trabalhos que utilizaram a qPCR para detecção de CMV, é possível inferir que a profundidade de sondagem (PS), menor no presente estudo, seja uma variável importante. Kubar *et al.* (2004) analisaram 16 pacientes com periodontite agressiva (PS 7.7 ± 1.5) e 15 pacientes sem doença (PS 2.1 ± 0.6), detectando CMV em 11 pacientes do primeiro grupo (68,7%). Nas amostras de nosso trabalho, os valores de PS média nos dentes foram de 3,7 mm e implantes 4,4 mm. Kubar *et al.* (2005) analisaram amostras de 9 pacientes com periodontite agressiva e 11 pacientes com periodontite crônica. No primeiro grupo, a PS média foi de 7,8 mm (DP 1,2 mm) e o CMV detectado em 77,8% , enquanto os pacientes com periodontite crônica, a PS média foi de 6,8 mm (DP 1,3 mm) com detecção de CMV em 45,4% dos pacientes. Vale ressaltar que a PS é o principal indicador associado à presença de periodontopatógenos, sendo a

quantidade de bactérias indicadoras diretamente proporcional ao aumento da PS. Saygun *et al.* (2002) encontraram 44,3% de CMV em suas amostras, e Yapar *et al.* (2003), encontraram 64% positivas para CMV nas amostras, ambos os estudos com pacientes com periodontite crônica e com bolsas mais profundas (5-7 mm e 7-10 mm respectivamente), nos estudos com PS de 2-3 mm, as amostras para CMV foram negativas, semelhantes aos resultados obtidos no presente trabalho.

Após a análise exploratória de dados, foram avaliados os valores de quantificação de bactérias totais e beta globina utilizando-se o teste de Student (teste T) para comparar as médias entre:

- ✓ dentes e implantes,
- ✓ dentes /implantes saudáveis e doentes,
- ✓ Perda de inserção (PI) 0-3 e 4-5.

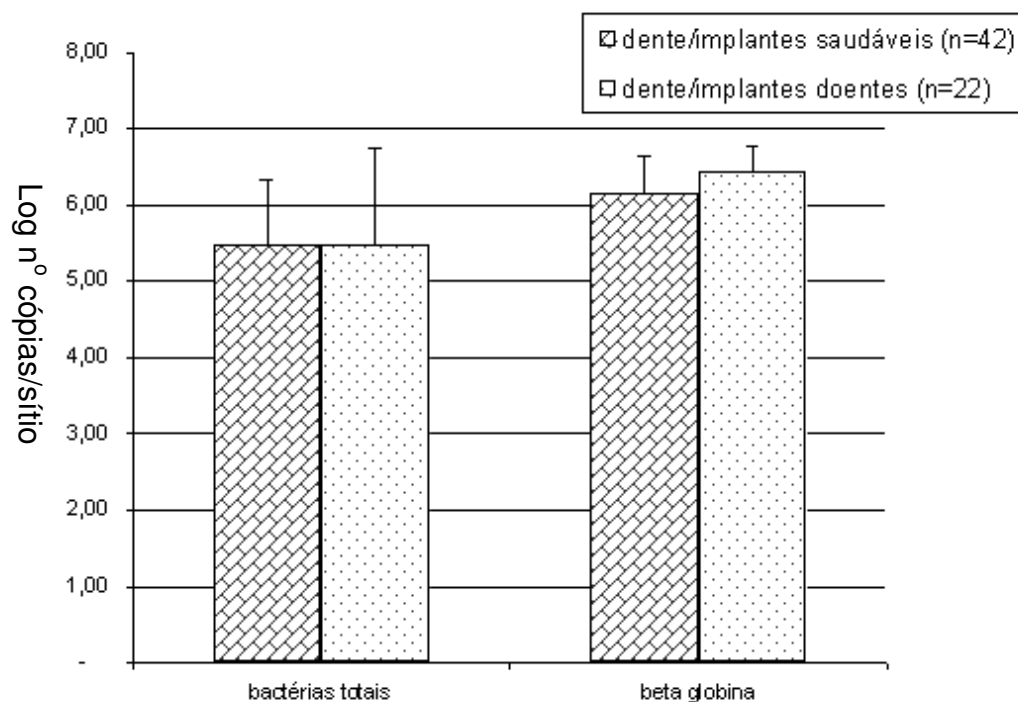
Na Figura 1 estão demonstradas as médias de bactérias totais e beta globina presentes nos dentes e implantes. Verificou-se que não houve diferenças significativas entre a presença de bactérias totais nos dentes e implantes como também da beta globina.



variável (log nº cópias/ sítio)	dente (n=32)		implante (n=32)		P
	Média	DP	Média	DP	
bactérias totais	5,65	1,09	5,32	0,87	0,18
beta globina	6,17	0,42	6,32	0,52	0,23

Figura 1: Média do log do número de bactérias totais e beta globina nos dentes e implantes.

Foram comparados os níveis de beta globina e bactérias totais entre os sítios de dentes e implantes saudáveis e doentes. Os dados (Figura 2) mostram ausência de diferença na quantidade de bactérias totais, porém, diferenças para a beta globina, sendo significativamente maior nos sítios doentes (dentes e implantes).



variável (log nº cópias/ sítio)	dente/implantes saudáveis (n=42)		dente/implantes doentes (n=22)		P
	Média	DP	Média	DP	
bactérias totais	5,48	0,84	5,48	1,25	0,997
beta globina	6,14	0,51	6,44	0,34	0,016

Figura 2: Média do log do número de bactérias totais e beta globina em dentes/implantes saudáveis comparados com dentes/implantes com sangramento (doentes).

Foi realizada também a comparação da quantidade de beta globina e bactérias totais em dentes e implantes com perda de inserção (PI) entre 0-3 comparados com dentes e implantes com PI entre 4-5. Não se observou diferenças significativas entre os níveis de beta globina e também das bactérias totais nos sítios com PI 0-3 e 4-5 (Figura 3). Estes resultados indicam que a PS, mais do que a PI, é o indicador clínico associado a alterações microbianas o que, de certa forma, pode significar um questionamento do papel das bactérias como fator de risco à PI.

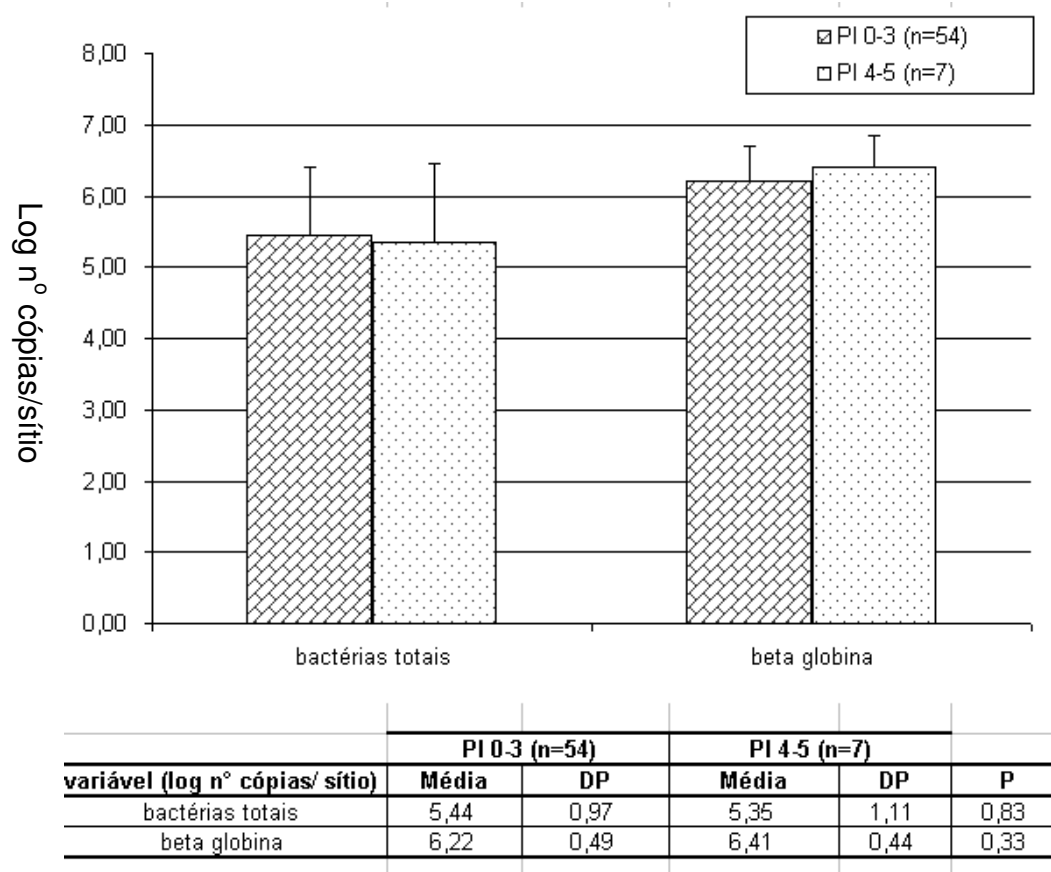


Figura 3: Média do log do número de bactérias e beta globina em sítios com PI (perda de inserção) 0-3 comparados com sítios com PI 4-5.

Quanto à variável profundidade de sondagem (PS) foram realizados testes de correlação com 1) os níveis de bactérias totais e 2) os níveis de beta globina por meio do método de Spearman para dados não paramétricos.

Não foi observada correlação significativa entre os níveis de bactérias totais e PS (coeficiente de correlação $-\rho = -0,154$; $p = 0,223$). Conforme demonstrado na Tabela 4, pode-se verificar que o aumento da PS está associado ao aumento dos níveis de beta globina. (coeficiente de correlação $-\rho = 0,347$; $p = 0,005$)

PS (mm)	N	Média	DP
2,0	2	5,74	0,12
3,0	22	6,06	0,46
4,0	18	6,39	0,34
5,0	18	6,45	0,36
6,0	2	6,65	0,14
7,0	1	6,09	-
8,0	1	4,55	-
Total	64	6,25	0,48

Tabela 4: Média dos níveis de beta globina nos sítios e profundidade de sondagem (PS) em dentes e implantes.

Na análise global das quantificações de bactérias totais, as seguintes considerações devem ser realizadas. As quantidades semelhantes de bactérias entre regiões perimplantares (5,32) e periodontais (5,65) já havia sido evidenciado por Takanashi et al. (2004). Além disto, as quantidades similares de bactérias totais em (5,48) em casos de amostras saudáveis como doentes, como também nas diferentes profundidades de sondagem sugerem que a diferença entre a população bacteriana nestes casos possam estar relacionados com as diferença de espécies bacterianas. Kasuga et al. (2000) em seu estudo identificaram uma correspondência de severidade de periodontias à associação de algumas bactérias como *P. gingivalis*, *B. forsythus*, e *T. denticola*. Kuboniwa et al. (2004) analisaram 10 pacientes com periodontite e 10 pacientes com periodonto saudável. Todas as

espécies, exceto *P. nigrescens*, foram detectadas nas amostras dos sítios doentes em número significativamente maior do que naqueles dos sítios saudáveis, enquanto o maior número de *P. nigrescens* foram encontrados no grupo controle.

A quantificação de beta globina foi utilizada neste trabalho com a intenção de testar sua eficiência como um marcador de gravidade de lesões bucais. Vários estudos relacionaram aumento da beta globina no plasma sanguíneo com severidade de traumas (Lo *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2003; Yurgel *et al.*, 2007). No presente trabalho, demonstrou-se que não houve diferenças entre as quantidades de beta globina entre implantes e dentes em relação a PI, mas as quantidades observadas em sítios doentes (dentes ou implantes) eram maiores ($p < 0,05$) do que as observadas em sítios saudáveis. Além disso, verificou-se (Tabela 4) que quanto maior a PS, maiores os níveis de beta globina (coeficiente de correlação – $\rho = 0,347$; $p = 0,005$). Não se sabe se estes resultados deram-se em função da magnitude da PS *per si* ou se em decorrência do traumatismo pós-sondagem. Mesmo nos estudos de trauma, onde há mais dados disponíveis, o mecanismo pelo qual o DNA livre circulante aumenta após trauma não está bem estabelecido. As altas concentrações precoces, observadas imediatamente após a lesão, sugerem que o DNA extracelular se origine do dano ao tecido (necrose), enquanto mecanismos de apoptose podem contribuir para os aumentos persistentes encontrados (Lam *et al.* 2003). Por outro lado, a sondagem não seria capaz de produzir danos apenas nos sítios mais profundos, sugerindo a presença constante, nestes sítios, de beta-globina. O real significado clínico destes achados, portanto, não está bem claro.

6- CONCLUSÕES

- A presença de bactérias totais e beta globina se mostraram bons marcadores de viabilidade das amostras.
- Não se detectou CMV em nenhuma das amostras estudadas.
- Não houve diferenças significativas entre a presença de bactérias totais nos sítios de *i)* dentes e implantes, *ii)* dentes e implantes saudáveis com doentes, *iii)* PI de 0-3 e 4-5 e nas diferentes PS.
- Não houve diferenças significativas entre a presença de beta globina nos sítios de dentes e implantes e nos sítios com PI de 0-3 ou 4-5.
- Os níveis de beta globina em dentes e implantes doentes é significativamente maior do que em dentes e implantes saudáveis.
- Foi observada um aumento da beta globina associado ao aumento da PS.

7- PERSPECTIVAS

Como perspectiva de continuidade desse estudo, um maior número de pacientes deve ser analisado, principalmente para a detecção de CMV. Os dados da literatura sugerem uma grande incidência deste patógeno em pacientes com lesões periodontais. Este estudo teve a limitação de analisar um pequeno número de pacientes, nos quais, os valores de PS eram < 5 mm. De uma forma geral, a literatura correlaciona a presença deste patógeno em amostras com valores de PS maiores (> 6 mm). Além disto, seria interessante a análise de outras infecções virais como HSV1, HSV2 e Epstein Bar bastante frequentes em lesões periodontais.

Também, como uma perspectiva de suma importância (e que já está em andamento), considera-se válida a quantificação de bactérias patogênicas como *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra*, *Tannerella forsythia* e que, possivelmente, irá completar os achados encontrados neste estudo.

Além disto, o presente estudo apresenta os primeiros indícios que a beta globina humana possa ser um marcador a ser melhor investigado em Periodontia/Implantodontia. Para tanto, um maior número de amostras com diferentes graus de gravidade e/ou condição inflamatória, periodontias e periimplantares (bem como em outras enfermidades bucais) devem ser realizadas para determinar a validade da utilização deste marcador.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M.H., BIANCHINI, M.A., MAGINI, R.S., RÖSING, C.K. Clinical and radiographic evaluation of periodontal and peri-implant conditions in patients with implant-supported prosthesis. *Acta odontológica latinoamericana*, v.20, p. 23-31, 2007.
- BOOM, R., SOL, C. J., SALIMANS, M. M., JANSEN, C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M., VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BOOM, R., SOL, C.J., SCHUURMAN, T., VAN BREDA, A., WEEL, J.F., BELD, M., TEN BERGE, I.J., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M., DE JONG, M.D. Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimens of renal transplant recipients is highly fragmented. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n^o 11, p.4105-4113, 2002.
- BOTERO, J. E., VIDAL, C., CONTRARAS, A., PARRA, B. real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiology Immunology*, v. 23, p. 239-244, 2008.
- BRÄGGER, U., BÜRGIN, W.B., HÄMMERLE, C.H., LANG, N.P. Associations between clinical parameters assessed around implants and teeth. *Clinical Oral Implants Research*, v. 8, n.5, p. 412-421, 1997.
- BRITT, W. J., ALFORD, C. A. Cytomegalovirus. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., et al., (editors). *Virology*. New York, N.Y: Raven Press, v. 3, p. 2493–2523, 1996.
- FAKHRY, C., D'SOUZA, G., SUGAR, E., WEBER, K., GOSHU, E., MINKOFF, H., WRIGHT, R., SEABERG, E., GILLISON, M. Relationship between Prevalent Oral and Cervical Human Papillomavirus Infections in Human Immunodeficiency Virus-Positive and -Negative Women. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 12, p. 4479–4485, 2006.
- CONTRERAS, A., SLOTS, J. Mammalian viruses in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 11, p. 381-386, 1996.
- CONTRERAS, A., UMEDA, M., CHEN, C., BAKKER, I., MORRISON, J.L., SLOTS J. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology*. v. 70, n.5, p.478-484. 1999.

- CRISCUOLI, V., RIZZUTO, M. R., COTTONE, M. Cytomegalovirus and inflammatory bowel disease: is there a link? *World Journal of Gastroenterology*, v. 12 n. 30, p. 4813-4818, 2006.
- CRUMPACKER, C.S. *Cytomegalovirus*. In: MANDELL, G.L., BENNETT, J.R., DOLIN, R. *Principles and Practice of infectious disease*. 6th ed. Livingstone: Elsevier Churchill, 2005, p. 1786-1801.
- FERREIRA, S. D., SILVA, G.L., CORTELLI, J.R., COSTA, J.E., COSTA, F.O. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 33, n.12, p. 929-935, 2006.
- NUALART-GROLLMUS, Z. C. N., CHÁVEZ, M. C. M., DONAT, F.J.S.. Periodontal disease associated to systemic genetic disorders. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, v. 12, p. 211-115, 2007.
- HARDT, C.R., GRÖNDAHL, K., LEKHOLM, U., WENNSTRÖM, J. L. Outcome of implant therapy in relation to experienced loss of periodontal bone support: a retrospective 5- year study. *Clinical Oral Implants Research*, v.13, n. 5, p. 488-494, 2002.
- HODINKA, R. L. *Human Cytomegalovirus*. In *Manual of Clinical Microbiology*. Vol II, 9th Edition, 2007.
- HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R., GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, n. 16, p.7276-7280, 1991.
- KAMMA, J.J., CONTRERAS, A., SLOTS, J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 28, n.9, p.879-85, 2001.
- KAROUSSIS, I.K., SALVI, G.E., HEITZ-MAYFIELD, L.J., BRÄGGER, U., HÄMMERLE, C.H., LANG, N.P. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clinical Oral Implants Research*, v. 14, n. 3, p. 329-339, 2003.
- KASUGA, Y., ISHIHARA, K., OKUDA, K. Significance of detection of porphyromonas gingivalis, bacteroides forsythus and treponema denticola in periodontal pockets. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, v. 41, n.3, p. 109-117, 2000.
- KUBAR, A., SAYGUN, I., ZDEMIR, A., YAPAR, M., SLOTS, J. Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of

- periodontitis lesions. *Journal of Periodontal Research*, v.40, p. 97-104, 2005.
- KUBAR, A., SAYGUN, I., YAPAR, M., OZDEMIR, A., SLOTS, J. Real-time PCR quantification of cytomegalovirus in aggressive periodontitis lesions using TaqMan technology. *Journal of Periodontal Research*, v. 39, n. 2, p.81-86, 2004.
- KUBONIWA, M., AMANO, A., KIMURA, K.R., SEKINE, S., KATO, S., YAMAMOTO, Y., OKAHASHI, N., IIDA, T., SHIZUKUIISHI, S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 19, n. 3 , p. 168-76, 2004.
- LAM, N.Y.L., RAINER, T.H., CHAN, L.Y.S., JOYNT, G.M., LO, Y.M.D. Time Course of Early and Late Changes in Plasma DNA in Trauma Patients. *Clinical Chemistry*, v. 49, n.8, p. 1286–1291, 2003.
- LI, H., DUMMER, J.S., ESTES, W.R., MENG, S., WRIGHT, P.F., TANG, Y.W. Measurement of Human Cytomegalovirus Loads by Quantitative Real-Time PCR for Monitoring Clinical Intervention in Transplant Recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n. 1, p.187-191, 2003.
- LO, Y.M.D., RAINER, T.H., CHAN, L.Y.S., HJELM, N.M., COCKS, R.A. Plasma DNA as a Prognostic Marker in Trauma Patients. *Clinical Chemistry*, v. 46, n. 3, p. 319–323, 2000.
- LO, Y.M.D., TEIN, M.S.C., LAU, T.K., HAINES, C.J., LEUNG, T.N., POON, P.M.K., WAINSCOAT, J.S., JOHNSON, P.J., CHANG, A.M.Z., HJELM, N.M. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *American Journal of Human Genetics*, v. 62, p. 768–775, 1998.
- LUTERBACHER, S., MAYFIELD, L., BRÄGGER, U., LANG, N.P. Diagnostic characteristics of clinical and microbiological tests for monitoring periodontal and peri-implant mucosal tissue conditions during supportive periodontal therapy (SPT). *Clinical Oral Implants Research*, v. 11, n.6, p. 521-529, 2000.
- MICHALOWICZ, B.S., RONDEROS, M., CAMARA-SILVA, R., CONTRERAS, A., SLOTS, J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology*. v. 71, n.6, p. 981-988. 2000.

- MEFFERT, R.M. Periodontitis vs. peri-implantitis: the same disease? The same treatment? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v.7, n.3, p. 278-91, 1996.
- MILMANN, I. M. *Condição Periodontal e Periimplantar em Pacientes Parcialmente Edentados*. Canoas, 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Luterana do Brasil.
- NONNENMACHER, C., DALPKE, A., MUTTERS, R., HEEG, K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *Journal of microbiological methods*. v.59, n.1, p.117-25, 2004.
- RAINER, T.H., WONG, L.K.S., LAM, W., YUEN, E., LAM, N.Y.L., METREWELI, C., LO, Y.M.D. Prognostic Use of Circulating Plasma nucleic Acid concentrations in Patients with Acute Stroke. *Clinical Chemistry*, v. 49, n.4, p. 562-569, 2003.
- RAZONABLE, R.R., BROWN, R.A., WILSON, J., GROETTUM, C., KREMERS, W., ESPY, M., SMITH, T.F., PAYA, C.V. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation*, v.73, n. 6, p.968-973, 2002a.
- RAZONABLE, R.R., PAYA, C.V. β -herpesviruses in transplantation. *Reviews in Medical Microbiology*, v.13, p.163-176, 2002b.
- ROMEO, E., GHISOLFI, M., CARMAGNOLA, D. Peri-implant diseases. A systematic review of the literature. *Minerva Stomatologica*, v. 53, n.5, p. 215-230, 2004.
- SALVI, G.E., LANG, N.P. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 19 Suppl, p. 116-127, 2004.
- SAYGUN, I., SAHIN, S., OZDEMIR, A., KURTIŞ, B., YAPAR, M., KUBAR, A., OZCAN, G. Detection of human viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters. *Journal of Periodontology*, v. 73, n. 12 p.1437-43, 2002.
- SLOTS, J. Herpesviral-bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 20, n. 3, p. 278-83, 2007.
- SLOTS, J. Update on human cytomegalovirus in destructive periodontal disease. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 19, p. 217–223, 2004.
- SMITH, J. S., MOSES, S., HUDGENS, M. AGOT, K., FRANCESCHI, S., MACLEAN, I., NDINYA-ACHOLA, J.O., PARKER, C.B., PUGH, N., MEIJER, C.J.L.M., SNIJDERS, P.J.F., BAILEY, R. C.. Human

- Papillomavirus Detection by Penile Site in Young Men from Kenya. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 34, n.11, p. 928–934, 2007.
- TAKANASHI, K., KISHI, M., OKUDA, K., ISHIHARA, K. Colonization by Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia from teeth to osseointegrated implant regions. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, v. 45, n. 2 p. 77-85, 2004.
- TAYLOR, G.H. Cytomegalovirus. *American Family Physician*, v.67, p. 519-524, 2003.
- TING, M., CONTRERAS, A., SLOTS, J. Herpesvirus in localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. v. 35, n.1, p.17-25. 2000.
- VAN DER BIJ, W., SPEICH, R. Management of Cytomegalovirus Infection and Disease after Solid-Organ Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, v.33, p.32-37, 2001.
- WENNSTRÖM, J.L., EKESTUBBE, A., GRÖNDAHL, K., KARLSSON, S., LINDHE, J. Oral rehabilitation with implant-supported fixed partial dentures in periodontitis-susceptible subjects. A 5-year prospective study. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 31, n. 9, p. 713-724, 2004.
- YAPAR, M., SAYGUN, I., OZDEMIR, A., KUBAR, A., SAHIN, S. Prevalence of human herpesviruses in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2003 Nov;74(11):1634-40.
- YURGEL, V.C., IKUTA, N., ROCHA, A.B., LUNGE, V. R., SCHNEIDER, R.F., FONSECA, A.S.K., GRIVICICH, I., ZANONI, C., REGNER, A. Role of Plasma DNA as a Predictive Marker of Fatal Outcome following Severe Head Injury in Males. *Journal of Neurotrauma*, v. 24, p. 1172-1181, 2007.
- ZITZMANN, N.U., SCHÄRER, P., MARINELLO, C.P. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 16, n. 3, p. 355-366, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)