

ESTUDOS DE FREQUÊNCIA, MORFOLOGIA E DIAGNÓSTICO DE *ENTAMOEBIA GINGIVALIS*, GROS, 1849

Silvio Favoreto Junior e Maria Inês Machado

Realizamos estudos de frequência de *Entamoeba gingivalis* entre 100 pacientes atendidos nos ambulatórios odontológicos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), utilizando-se esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou modificado, revelando um expressivo índice de 62% de positividade. A afinidade do corante pelo conteúdo vacuolar fagocítico impede uma nítida visualização das cromatinas central e periférica do núcleo do parasita. Lavados bucais de outros 10 pacientes foram utilizados para avaliar em qual método parasitológico de diagnóstico (a fresco e em coloração por hematoxilina férrica, Giemsa e Papanicolaou) ocorre melhor visualização do parasita. O exame a fresco do sedimento do lavado bucal revelou 100% de positividade e nítida visualização do parasita. Nenhuma técnica de coloração dos esfregaços se mostrou adequada, apresentando o núcleo freqüentemente mascarado pelos vacúolos fagocíticos. Em preparações coradas por azul de toluidina e na microscopia eletrônica de transmissão pode-se observar caracteres morfológicos típicos do protozoário.

Palavras-chaves: *Entamoeba gingivalis*. Protozoários orais. Doença periodontal. Diagnóstico estomatológico.

Na cavidade oral humana encontram-se populações microbianas polimórficas, constituídas principalmente por bactérias, leveduras, partículas virais, micoplasmas e apenas dois protozoários: *Entamoeba gingivalis* e *Trichomonas tenax*.

Durante a transferência interpessoal dessa população microbiana ocorre a troca de pelo menos, 10 mil unidades de *Porphyromonas gingivalis*, o principal agente da periodontite, 500 mil unidades da bactéria *Streptococcus mutans*, o maior causador da cárie, e outras centenas de milhares de lactobacilos, seus causadores secundários¹⁹. O reconhecimento de que tanto a cárie como a gengivite e a periodontite são infecções passíveis de transmissão é pouco difundido, entretanto necessário na manutenção da saúde dos tecidos bucais.

O trofozoíto de *E. gingivalis*, única forma no ciclo vital do parasita, possui movimentação rápida através de pseudópodes lobosos, grandes e hialinos²⁰. O núcleo possui estrutura característica do gênero.

O substrato para nutrição de *E. gingivalis* é composto basicamente de leucócitos, células

epiteliais e bactérias^{7,8}. Segundo Wantland & Wantland²⁷, *E. gingivalis* é capaz de executar citólise de eritrócitos e leucócitos. Rysky & Sapelli²² afirmam que em 80% dos espécimes examinados havia eritrofagocitose.

Segundo Desowitz⁹, o protozoário não está livremente distribuído na cavidade bucal e sim restrito aos acúmulos de placa dental. De modo geral, os autores consideram que o acúmulo de placa bacteriana e as patologias decorrentes deste fato propiciam o aumento da frequência de *E. gingivalis*. Omnes¹⁸ estudando indivíduos com gengivas sadias observou no máximo 19,1% de casos positivos, enquanto nos indivíduos com patologia gengival apresentaram 51,9% de positividade para *E. gingivalis*. O mesmo autor afirma que o índice de positividade para protozoários orais aumenta com a diminuição da qualidade da higiene oral; no entanto, uma excelente higiene pode evitar, porém não exclui a possibilidade de contaminação. É consenso entre os autores que é necessário um substrato sólido (órgão dental ou próteses) para que *E. gingivalis* se estabeleça⁵.

Quanto à frequência, Rousset & Lauvergeat²¹, estudando 250 adultos jovens em Paris, detectaram 11,1% de indivíduos parasitados que afirmam jamais terem mantido contato labial; Takada²³ descreve o encontro de 6,5% de indivíduos parasitados em idade escolar e 14% entre pacientes odontológicos

Departamento de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

Endereço para correspondência: Prof. Silvio Favoreto Junior. Depto. de Patologia/UFU. Av. Pará 1720, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG.

Recebido para publicação em 10/02/95.

na cidade de Osaka, no Japão. É sabido que boa parte da população oriental pratica, com restrições, o ato erógeno do contato labial. Esses dados demonstram que pode ocorrer o processo de contágio imediato. Compartilhar alimentos, copos ou talheres pode ser uma importante fonte de infecção, pois segundo Desowitz⁹, os trofozoítos de *E. gingivalis* sobrevivem até 48 horas a 15°C e são moderadamente resistentes à dessecação.

Não observamos, na literatura consultada, dados consistentes de que a infecção tenha preferência por sexo, no entanto a idade parece ser o fator mais importante na epidemiologia de *E. gingivalis*⁸. Normalmente, observa-se significativo aumento de positividade após a faixa etária de 15 anos⁶.

Alguns autores consideram a possibilidade de *E. gingivalis* estar envolvida na etiologia das doenças periodontais. Afirmam que se fundamenta no relato de melhora do quadro gengival após o uso de drogas de conhecida eficácia amebicida como: hidrocloreto de emetina, um derivado da ipecacuanha¹⁶ e o metronidazole¹⁴. Lyons & Scholten¹⁶ aventam a hipótese de *E. gingivalis* carrear partículas virais no seu citoplasma ou incrustadas no genoma amebiano servindo como veículo para a infecção viral.

Vários métodos de diagnóstico de *E. gingivalis* são descritos, diferindo quanto à sensibilidade e consenso de eficácia. A maioria dos autores descreve a cultura *in vitro* como método eficaz para detecção do parasita; outros, defendem a utilização de esfregaços corados por diferentes técnicas e outros, ainda, se utilizam de exames a fresco de material obtido por lavado bucal^{3 6 8 10 11}.

Quanto aos protozoários orais, após quase dois séculos da descrição de ambos os parasitas, são ainda hoje pouco esclarecidas as questões relativas à epidemiologia, biologia, morfologia e diagnóstico desses organismos especialmente *E. gingivalis*, daí nosso interesse pela parasitologia oral bem como sua correlação com a saúde bucal.

MATERIAL E MÉTODOS

População estudada. A população estudada foi dividida em dois grupos: o grupo I, constituído de 100 pacientes e o grupo II, constituído de 10 pacientes; ambos, procedentes dos serviços de Pronto Socorro (PSO) e Ambulatório Odontológico da

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, no período de julho de 1990 a março de 1993. Todos os pacientes foram submetidos à investigação clínica e epidemiológica. O estado periodontal e índice de higiene oral foram avaliados utilizando-se os critérios de Russell modificados por Rigueira¹⁹.

Colheita e análise parasitológica das amostras. No grupo I, as amostras de placa bacteriana e matéria alba foram colhidas com swabs estéreis umedecidos em solução salina, os quais foram friccionados em quatro diferentes sítios da cavidade oral: crista marginal da gengiva superior, crista marginal da gengiva inferior, dentes portadores de processo carioso e região dorsal da língua. Para cada sítio de colheita foram confeccionados esfregaços em duplicata, corados pela técnica de Papanicolaou modificada¹⁰. A positividade para *E. gingivalis* foi indicada quanto à visualização de formas trofozoíticas do parasita por exame em microscopia ótica com imersão (Olympus BH2).

No grupo II, as amostras foram colhidas por bochecho de 3ml de solução fisiológica, por no mínimo 30 segundos. O pH do lavado foi aferido imediatamente após a colheita e as amostras foram centrifugadas a 500rpm durante 5 minutos. Uma gota do sedimento obtido, disposta entre lâmina e lamínula, foi submetida ao exame parasitológico a fresco realizado no máximo 2 horas após a colheita. A positividade para *E. gingivalis* foi indicada quanto à visualização de formas trofozoíticas do parasita por exame parasitológico a fresco em microscopia ótica com aumento de 400 vezes, seguindo caracteres taxonômicos específicos, tais como: movimentação, tamanho, aspecto do citoplasma e emissão de pseudópodes. A cada exame, vinte formas livres e de locomoção foram fotografadas para posterior análise de mensuração.

Das amostras consideradas positivas, no exame parasitológico a fresco, foram confeccionados esfregaços em triplicata, fixados com solução de álcool polivinílico (PVA) e corados, sendo lâminas da mesma amostra submetidas a três diferentes colorações: Papanicolaou¹⁰, hematoxilina férrica¹¹ e Giemsa⁸.

Análise morfológica de E. gingivalis em microscopia ótica e eletrônica de transmissão.

O sedimento das amostras positivas foi imediatamente fixado por 2 horas em solução Karnovsky²² e novamente submetidos à centrifugação a 500rpm por 5min. O sedimento foi solidificado pela adição de 1ml de Agar Noble 4% liquefeito. Após a solidificação, o bloco foi recortado, e processado pela técnica clássica para microscopia eletrônica de transmissão utilizando resina Epon 812²³. Cortes semi-seriados de 2 micrômetros de espessura foram obtidos em um ultramicrotomo Ultracut a fim de localizar *E. gingivalis* no material incluído. Os cortes foram então corados com solução de azul de toluidina (0,25% em borato de sódio a 1% em água destilada) e examinados. Após detecção do parasita foram feitos cortes ultrafinos processados para análise em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109).

Análise Estatística. Para análise estatística dos dados obtidos foram feitas combinações binárias de variáveis e utilização do índice de correlação de Pearson e teste qui quadrado (χ^2).

RESULTADOS

Estudos de freqüência. O percentual de freqüência global de *E. gingivalis* na população do grupo I foi de 62%. Quanto à variável epidemiológica de sexo não houve variação estatisticamente significativa entre o sexo masculino (68%) e feminino (55,3%).

Analisando o percentual de positividade do grupo I, em relação à idade, os pacientes na faixa etária de 11 a 20 anos apresentaram 76% de positividade, resultado estatisticamente significativo quando comparado à freqüência dos pacientes de 0 a 10 anos ($p < 0,05$). As demais faixas etárias não apresentaram diferenças significativas (Tabela 1).

Tabela 1- Freqüência de *E. gingivalis* no grupo I em função da idade.

Idade	Total de examinados	Pesquisa de <i>E. gingivalis</i>			
		positivo		negativo	
		nº	%	nº	%
0 - 10	4	1	25,0	3	75,0
11 - 20	25	19	76,0	6	24,0
21 - 30	35	21	60,0	14	40,0
31 - 40	20	11	55,0	9	45,0
41 - 50	10	6	60,0	4	40,0
51 - 60	3	2	66,7	1	33,3
61 - 70	2	2	100,0	0	0,0
71 - 80	1	0	0,0	1	100,0

$p > 0,05$

Quanto à higiene da cavidade oral, embora nenhum dos pacientes tenha alcançado o escore "excelente", observamos a presença de *E. gingivalis*, em todas as demais classificações, sem variação estatisticamente significativa entre os escores (Tabela 2).

Tabela 2- Freqüência de *E. gingivalis* no grupo I em função do Índice de Higiene Oral (IHO).

IHO	Total de examinados	Pesquisa de <i>E. gingivalis</i>			
		positivo		negativo	
		nº	%	nº	%
Excelente	0	0	0,0	0	0,0
Bom	23	12	52,0	11	48,0
Regular	25	13	52,0	12	48,0
Ruim	32	23	72,0	9	28,0
Péssimo	20	14	70,0	6	30,0

$p > 0,05$

A Tabela 3 apresenta a distribuição de positividade de acordo com os sítios bucais analisados, onde não observamos variação significativa entre as diferentes regiões pesquisadas para a presença do parasita. A distribuição da freqüência de *E. gingivalis* entre diferentes categorias ocupacionais: estudantes (60%), assalariados (62,5%), donas de casa (64%) e profissionais liberais (60%) não havendo variação estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 3 Freqüência de *E. gingivalis* no grupo I em função do Sítio Bucal Examinado (SBE).

SBE	Total de sítios examinados	Pesquisa de <i>E. gingivalis</i>			
		positivo		negativo	
		nº	%	nº	%
Cárie	100	29	29,0	71	71,0
Gengiva superior	100	35	35,0	65	65,0
Gengiva inferior	100	24	24,0	76	76,0
Língua	100	27	27,0	73	73,0

$p > 0,05$

Métodos de identificação, estudo morfológico e diagnóstico parasitológico de *E. gingivalis*. Para análise de identificação, morfologia e avaliação de métodos de diagnóstico foi utilizado o grupo II, onde todos os pacientes se mostraram portadores de *E. gingivalis*, pelo exame parasitológico direto a fresco. A identificação de formas trofozoíticas de *E. gingivalis*, revelou características taxonômicas específicas, relativas ao tamanho

entre as formas livres (parasita não aderido ao vidro) e formas de locomoção (parasita aderido ao vidro) que variou na razão de 32 e 70 micrômetros, respectivamente, nos 20 espécimes mensurados.

A velocidade na locomoção e tipo de pseudópode emitido foram observados em todos os espécimes e caracterizados como "emissão rápida", do tipo loboso e

unidirecionais quando o parasita se apresentava na forma de locomoção e multidirecionais quando em forma livre. O citoplasma foi distinguível ao exame a fresco em ectoplasma hialino e endoplasma granuloso (Figuras 1a, 1b e 1c).

Nenhuma das técnicas de coloração dos esfregaços utilizadas mostrou-se adequada a visualização e identificação de *E. gingivalis*. As

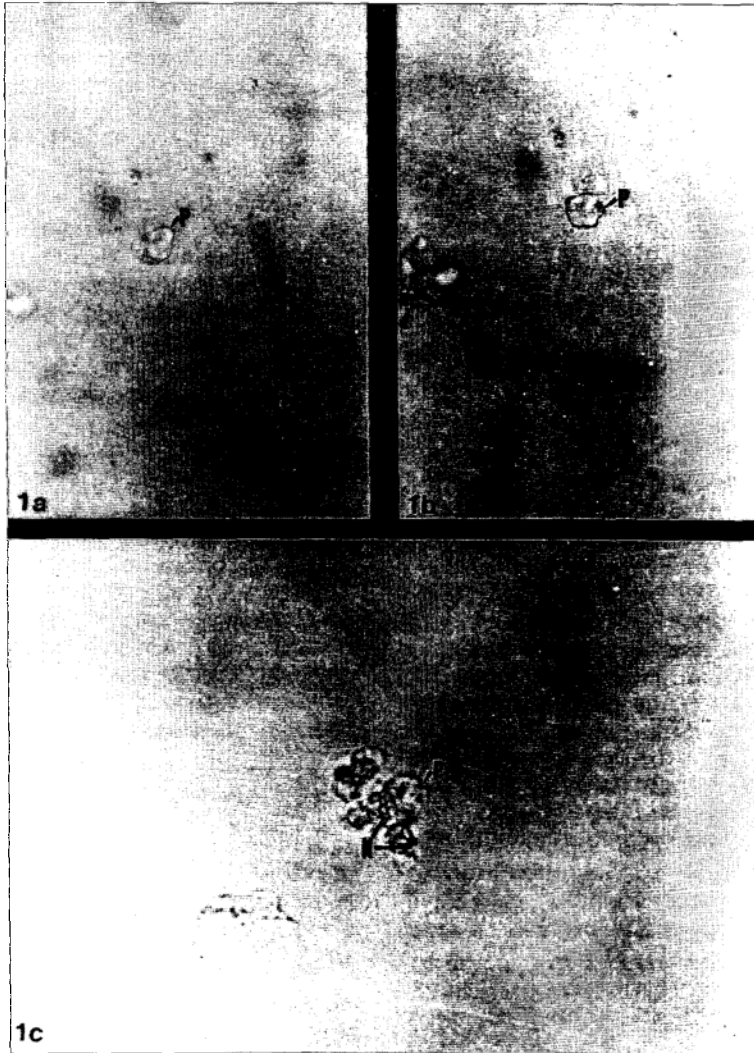


Figura 1a) *E. gingivalis* aderida ao vidro (forma de locomoção) ao exame parasitológico a fresco. Observar a emissão de pseudópodes (P). Fotomicrografia, exame a fresco, 120X; 1b) Observação continuada, após 5 segundos, do mesmo campo demonstrado na Figura 1a. Notar modificação morfológica do protozoário indicando emissão e recolhimento de pseudópodes (P). Fotomicrografia, exame a fresco, 120X.; 1c) *E. gingivalis* não aderidas ao vidro (formas livres) ao exame parasitológico a fresco. Observar núcleos (N) e pseudópodes (P) dos protozoários. Fotomicrografia, exame a fresco, 240X.

técnicas de coloração de Papanicolaou, hematoxilina fêrrica e Giemsa apresentaram forte afinidade por vacúolos fagocíticos mascarando núcleo do parasita e dificultando o diagnóstico diferencial do amebídeo.

A observação em microscopia de luz dos cortes semifinos, após fixação e coloração com azul de toluidina, mostrou que *E. gingivalis* possuía, em média 29 micrômetros em seu maior eixo. No citoplasma observamos granulações fortemente coradas pelo azul de

toluidina, núcleo bem definido, medindo em torno de 10 micrômetros de diâmetro, a cromatina periférica e o cariossoma bem evidentes, apresentando igual afinidade pelo corante, as demais áreas do núcleo eram predominantemente eucromáticas (Figuras 2a e 2b).

Em microscopia eletrônica de transmissão confirmamos a estrutura nuclear típica dos amebídeos, poucos ribossomas foram vistos aderidos aos complexos de membrana. No



Figura 2a) No centro da figura, observar *E. gingivalis* com estrutura nuclear característica. Circundando o protozoário há células inflamatórias. Fotomicrografia, Epon 812, azul de toluidina, 560X; 2b) *E. gingivalis* com estrutura nuclear característica e grânulos corados no citoplasma. Fotomicrografia, Epon 812, azul de toluidina, 850X.

citoplasma foram observados vacúolos eletrondensos sugestivos de lisossomas e vacúolos contendo resíduos de estrutura nuclear de células fagocitadas, bactérias e material amorfo. Grânulos de glicogênio dispersos ou agrupados, aleatoriamente, foram observados no citosol. Retículo endoplasmático e complexo de Golgi típicos não foram identificados; poucas mitocôndrias possuindo pequeno número de cristas eram

presentes. A membrana plasmática, recoberta por glicocálice, apresentou projeções lobosas e filiformes (Figura 3).

DISCUSSÃO

O percentual de frequência de parasitismo observado no grupo I foi superior aqueles anteriormente observados em nosso país^{11 24 25}. Cambom⁵ e Wantland & Wantland²⁷ nos



Figura 3 - *E. gingivalis* vista ao microscópio eletrônico. Notar estrutura nuclear característica, grânulos eletrondensos, eletrólucidos dispersos e fagossomas contendo material floculado que são vistos inclusos no citoplasma (quadrante superior direito da foto). No quadrante inferior direito pode-se observar fagossoma apresentando conteúdo em avançado estágio de digestão. Eletromicrografia, 16.000X.

chamam a atenção com relação aos percentuais de freqüência geral obtidos por diferentes autores (Rousset & Lauverveat²¹, 29,6%; Lapiere & Rousset¹⁵, 41,0%; Cambom³, 86,4% e Feki & Molet¹⁶, 32,7%).

Entre 20 estudos selecionados no período de 1923 e 1993, desenvolvidos em diferentes países, 9 mostraram prevalência acima de 50,0% e apenas 4 abaixo de 30,0%. Este fato provavelmente se deve pela utilização de diferentes técnicas de diagnóstico empregadas pelos autores e pela diversidade de populações estudadas.

No presente estudo, embora os percentuais aumentem com a idade, os valores de positividade distribuídos nas faixas etárias de 0 a 80 anos, não demonstraram significância estatística. Apenas as correlações de freqüência na faixa etária dos 11-20 anos mostrou significância estatística quando comparada à faixa limítrofe inferior. A influência da idade sobre a presença de *E. gingivalis* é assinalada por diversos pesquisadores^{2, 3, 4, 11, 12, 17, 27, 28}. A maioria deles está de acordo que a freqüência de *E. gingivalis* aumenta com o aumento da idade antigindo valores máximos proporcionais a partir de 20 anos.

Em nosso inquérito, a presença de *E. gingivalis* foi um pouco mais elevada no sexo masculino que no feminino, entretanto sem significância à nível estatístico. Dados coincidentes com o observado por Cechova⁶ (53,01% para o sexo masculino e 50,45% para o feminino). A questão está em aberto, se a diferença relacionada ao sexo é um fator primário ou se há uma dependência secundária onde os níveis de higiene oral e o número de dentes variem entre homens e mulheres.

Quanto à higiene oral, considera-se que a população em estudo corresponde àquela que por vários motivos procura os serviços ambulatoriais e de Pronto Socorro, portanto não correspondendo a uma amostragem da população em geral^{16, 17, 20}. Quanto à correlação entre a presença de *E. gingivalis* e o Índice de Higiene Oral não constatamos que freqüência de parasitismo esteja relacionada com a diminuição deste índice.

A maioria dos autores concorda que embora a qualidade da higiene dentária favoreça a implantação de *E. gingivalis*, esta não parece ser uma característica obrigatória,

já que a freqüência é também alta em indivíduos com escore "bom" no Índice de Higiene Oral³.

Dentre os sítios bucais examinados, a gengiva superior mostra um percentual de freqüência ligeiramente maior que os demais sítios; a nível estatístico, a pesquisa em vários sítios não é significativa na positividade para *E. gingivalis*. Resultado semelhante foi constatado por Gannon & Linke¹⁰ que pesquisaram 32 locais da cavidade oral para a presença de *E. gingivalis* e concluíram não haver sítio específico para a colonização pelo protozoário.

A semelhança de nossos resultados, correlações de freqüência de *E. gingivalis* com categorias profissionais têm sido procuradas sem conclusões significativas, mesmo em estudos com populações bastante diversificadas^{23, 26}.

Os 10 pacientes do grupo II foram utilizados para os estudos de diagnóstico em nosso inquérito, onde optamos pela padronização de uma variante do exame parasitológico a fresco, diferindo da técnica clássica, pela utilização do lavado bucal para colheita do material a ser pesquisado. Esta variação mostrou-se excelente para a nítida visualização do parasita. Como já demonstrado¹⁰ não há sítio preferencial para localização de *E. gingivalis* na cavidade bucal. Esta condição permite recomendar a utilização da técnica do lavado bucal para a pesquisa direta e diagnóstico do protozoário baseado na simplicidade da técnica, rapidez na obtenção do resultado específico e a alta sensibilidade.

Não observamos vantagem na utilização de esfregaços corados, pois freqüentemente os corantes nucleofílicos apresentavam grande afinidade pelos vacúolos fagocíticos, fato em parte explicado pela fagocitose de núcleos de leucócitos por *E. gingivalis*, impossibilitando sua identificação. Neste estudo não encontramos formas que indicassem tratar-se de cistos, dados concordantes com o observado na literatura^{10, 13}.

A grande diferença entre os diâmetros médios encontrados nas formas livres e de locomoção é coerente, já que, para locomoção é necessária adesão e conseqüente espriamento do protozoário. O padrão de emissão de pseudópodes assemelha-se ao descrito por Wantland & Wantland²⁷.

A observação de *E. gingivalis* em cortes semifinos mostrou que a técnica não gerou

alterações no tamanho e aparência do protozoário, preservando as medidas semelhantes à forma livre observada no exame à fresco. O grau de nitidez na visualização do parasita, com a utilização deste método, corrobora com a sua indicação para o estudo morfológico em microscopia ótica de *E. gingivalis*.

A morfologia a nível ultra-estrutural revelou cariossoma bastante evidente porém indicando função diferente do nucléolo nos eucariotos superiores já que a quantidade de ribossomas era bastante reduzida; esta hipótese é suportada pelos estudos de Wollaughin & Aley²⁹ em *Entamoeba histolytica*. Os grânulos eletrondensos são sugestivos de lisossomas, no entanto a falta de maquinaria específica para sua produção dificulta a interpretação e indica existência de vias exclusivas na produção de enzimas líticas. A presença de poucas mitocôndrias possuindo pequeno número de cristas sugere que *E. gingivalis* possui metabolismo microaerófilo, dado consubstanciado por Gannon & Linke¹⁰. Os grânulos de glicogênio no citoplasma evidenciam que a principal fonte de energia seja a glicose, a semelhança do que ocorre em *E. histolytica*²⁹. O delgado glicocálice, também observado por outros autores¹³ pode estar relacionado com a virulência no processo de adesão do protozoário ao substrato²⁹. As projeções lobosas da membrana indicam a emissão de pseudópodes, enquanto as filiformes podem estar associadas ao processo de excitose do parasita²⁹.

Os dados relatados sobre a epidemiologia, diagnóstico, morfologia e aspectos fisiológicos, derivados destas observações, podem contribuir para o esclarecimento da biologia deste intrigante protozoário, conduzindo a estudos posteriores para o melhor entendimento de *E. gingivalis* e sua influência na saúde da cavidade oral.

SUMMARY

Entamoeba gingivalis is found only in its trophozoite form and it is postulated that its main transmission mechanism is through the kiss. *E. gingivalis* is considered pathogenic by some authors and commensal to others. It does not have a defined role in the installation of disease. To address some of this questions we studied a 100 patients who were seen through the Odontological Hospital from the Universidade Federal de Uberlândia in order to

determine its frequency in the buccal cavity. The material were collected using swabs from four different buccal sites and the smears were stained by a modified Papanicolaou technique. The results revealed positivity index of 62%. The affinity of the dye to the food vacuole contents and to the ingested bacteria prevents clear visualisation of the central and peripheral chromatin constituents of the parasite's nucleus. Mouth washes with 3ml of saline from 10 patients, were used to evaluate which parasitological method of diagnosis (fresh, iron-haematoxylin stained, Giemsa and Papanicolaou) gives better visualisation of the parasite. The mouth washes sediment from fresh material revealed 100% of positivity and clear visualisation of the free form and locomotion of the trophozoites. No stained technique of the smear showed adequate visualisation, presenting the nucleus partially covered by the food vacuoles. In stained preparations by toluidine blue ultrastructure analysis of the morphology of parasite can be observed.

Key-words: *Entamoeba gingivalis*. Oral protozoa. Periodontal disease. Oral diagnosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaral ADE. Sobre a incidência de *Entamoeba gingivalis*. Revista Paulista de Medicina 35:217, 1949.
2. Bonvini E, De Carneri I. Ricerca di *Entamoeba gingivalis* e di *Trichomonas tenax* nei bambini di età inferiore ai cinque anni. Giornale di Maladie Infeciosa i Parasitaria 14:361-362, 1962.
3. Cambon M. Étude des protozoaires et di levures de la cavité buccale chez 509 sujets normaux ou diabetiques. Tese de Doutorado. Faculté de Pharmacie - Université de Clermont I, Clermont-Ferrand, 1978.
4. Cambon M. Étude des parasites de la cavité buccale chez 45 enfants de 6 a 15 ans. Pediatrice 34:203-209, 1979.
5. Cambon M. Étude de la fréquence des protozoaires et des levures de la cavité buccale chez l'homme. Actualité Odontostomatologique 130:279-286, 1980.
6. Cechova L, Leifertová I, Lisa M. The incidence of *Entamoeba gingivalis* in the oral cavity. Medical Acta of North Caroline University 33:549-559, 1987.
7. Child HA. Studies on the ingestion of leucocytes and on mitosis in *Entamoeba gingivalis*. University California Publication - Zoology 28:1122-1135, 1926.

8. Dao AH, Robinson P, Wong SW. Frequency of *Entamoeba gingivalis* in human gingival scrapings. *American Journal of Periodontology* 80:380-382, 1983.
9. Desowitz RS. Oral Parasitology. In: Mc Ghee JRI. (ed) *Dental Microbiology*, Harper & Row, Philadelphia, p. 678, 1982.
10. Gannon JT, Linke HAB. Studies on the microflora associated with xenic cultures of *Entamoeba gingivalis*. *Microbios* 59:95-100, 1989.
11. Giuzzi JF. Contribuição para o estudo dos protozoários bucais em 700 indivíduos da população de Araraquara, Estado de São Paulo. São Paulo. Tese de Doutorado, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
12. Grisi AM, De Carneri I. Frequenza dell' infezione da *Trichomonas tenax* e *Entamoeba gingivalis* in soggetti in età giovanili. *Parassitologia* 5:157-159, 1963.
13. Keller O, Orland FJ, Baird G. Ultrastructure of *Entamoeba gingivalis*. *Journal of Dental Research* 46:1010-1018, 1967.
14. Lacour M, Grappin G. Traitement de la gingivostomatite ulcéreuse par le métronidazole. *Bulletin de la Société de Médecine Noire* 13:408-410, 1968.
15. Lapierre J, Rousset JJ. L'infestation à protozoaires buccaux. *Annales de Parasitologie* 48:205-216, 1973.
16. Lyons R, Scholten T. The role of *Entamoeba gingivalis* in periodontal disease. *Quintessence Internationale* 36:345-352, 1983.
17. Miligi G, Magaudda-Borzi L, Mento G. La frequenza dei portatori di *Trichomonas tenax* e di *Entamoeba gingivalis* in alcune zone della provincia di Messina. *Archivi Italiani di Medicina Tropicale* 45:95-99, 1964.
18. Omnes N. Contribution à l'étude des atteintes parodontales par le *Trichomonas tenax* et *Entamoeba gingivalis*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Paris VII, Paris, 1975.
19. Rigueira A. *Periodontia Clínica*, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.
20. Rousset JJ, Laissus B. Premières données sur l'enzootie canine à *Trichomonas tenax* et *Entamoeba gingivalis*. Leur fréquence en France. *Société Française de Biologie* 12:1468-1469, 1970.
21. Rousset JJ, Lauvergeat JA. Protozoaires buccaux, enquête épidémiologique. *Presse Medicale* 79:1495-1496, 1971.
22. Rysky S, Sapelli P. Ultrastructure of oral protozoans. *Bulletin of International Research in Stomatological Science* 20:229-258, 1977.
23. Takada S, Yamada S, Tsurutami M. Epidemiological observation of protozoa in the human oral cavity. *Journal of Osaka Medical Center* 9:291-294, 1960.
24. Verri RA, Barros E. Estudos sobre protozoários parasitas da boca humana. *Revista Gaúcha de Odontologia* 14:28-35, 1966.
25. Verri RA, Salata I. Estudos sobre protozoários parasitas da boca humana - I. *Entamoeba gingivalis*, Gros, 1849. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas* 15: 252-260, 1961.
26. Wantland WW, Lauer D. Correlation of some oral hygiene variables with age, sex, and incidence of oral protozoa. *Journal of Dental Research* 49:293-296, 1970.
27. Wantland WW, Wantland EM. Studies in human mouth protozoa. *Journal of Dental Research* 37:949-950, 1958.
28. Wantland WW, Wantland EM, Winquist DL. Collection, identification and cultivation of oral protozoa. *Journal of Dental Research* 42:1234-1241, 1963.
29. Wollaughin J, Aley S. The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba*. *The Journal of Protozoology* 32: 221-240, 1985.