DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
Área de Concentração em Periodontia

FÁBIO MATOS CHIARELLI

INFLUÊNCIA DA TERAPIA PERIODONTAL NA FREQUÊNCIA DE *ARCHAEA* EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA

Guarulhos
2012

FÁBIO MATOS CHIARELLI

INFLUÊNCIA DA TERAPIA PERIODONTAL NA PREVALÊNCIA DE *ARCHAEA* EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA

Tese apresentada à Universidade Guarulhos
para obtenção do título de Doutor em Odontologia
Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Profª. Drª. Luciene C. de Figueiredo
Co-orientador: Prof.Dr. Marcelo de Faveri

Guarulhos
2012

C532i

CHIARELLI, Fabio Matos
Influencia da terapia periodontal na prevalência de Archaea em indivíduos com periodontite agressiva generalizada. / Fabio Matos Chiarelli. Guarulhos, 2012.
50 f. : il. ; 31 cm

Dissertação (Doutorado em Odontologia) - Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, 2012.
Orientador: Prof. Dra: Luciene Cristina de Figueiredo
Bibliografia: f.

1. Archaea . 2. periodontite agressiva generalizada . 3. terapia periodontal. I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 22st 617.6

Ficha catalográfica elaborada pela Coordenação da Biblioteca Fernando Gay da Fonseca

UnG

CEPPE
Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "INFLUÊNCIA DA TERAPIA PERIODONTAL NA PREVALÊNCIA DE *ARCHAEA* EM INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA" em sessão pública realizada em 03 de Agosto de 2012 considerou o candidato Fábio Matos Chiarelli aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo (UnG)_____

2. Profa. Dra. Susana D'Avila (ADOCI) _____

3. Profa. Dra. Flavia Matarazzo (UEM) _____

4. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UnG)_____

5. Prof. Dr. Leandro Chambrone (UnG)_____

Guarulhos, 03 de Agosto de 2012.

DEDICATÓRIA

A Deus, Toda Honra e Toda Glória. Consagro a Ele toda a minha vida.

A minha fiel esposa, Fabíola Chiarelli, pelo grande apoio e incentivo, principalmente, por ter sido pai e mãe de nossos filhos, quando precisava me ausentar nestes quatro anos.

Aos meus filhos, Augusto, e Victória Chiarelli, cujo amor e apoio incondicionais permitiram-me continuar em busca de sonhos.

Aos meus queridos pais José e Lucia Chiarelli que sempre prezaram por minha boa formação cultural, ética, moral e espiritual, que me apoiaram integralmente na minha carreira.

Vocês são os grandes responsáveis por mais esta vitória, amo demais vocês.

AGRADECIMENTOS

A Minha Orientadora, Prof. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo, que me conduziu na elaboração deste estudo e que, a partir dessa experiência, tornou-se ainda mais admirável, o meu muito obrigado. Te admiro e respeito muito pela sua competência e disposição ao ensinar.

Ao co-orientador deste estudo, Prof. Dr. Marcelo de Faveri, que gentilmente contribuiu com sua experiência e trabalho para que este estudo pudesse ser concluído. Expresso aqui minha imensa gratidão.

Ao Grande Mestre, Prof. Dr. Alfredo Feitosa (UFES), pelos ensinamentos transmitidos em 15 anos de convívio diário e por sempre destacar a importância da busca contínua de novos conhecimentos, o que nos propicia uma base sólida em nossa formação científica, pela dedicação ao aprimoramento da Periodontia, servindo-nos de paradigma.

A Coordenadora da Pós-Graduação em Odontologia da UNG, Professora. Dra. Magda Feres, por me permitir realizar este sonho tão distante da minha realidade em me proporcionar uma pesquisa clínica. A senhora devo todo o meu respeito e gratidão para sempre!

Aos Professores Doutores do programa do doutorado da UNG, Marcelo de Faveri, Jamil Shibli, Poliana Duarte, Marta F. Bastos, Leandro Chambrone , obrigado pela real amizade e tanta competência demonstrada, pois vendo a dedicação e vocação de vocês ao ensinar seus alunos. Tenho vocês como exemplo profissional e pessoal.

A minha cunhada farmacêutica Dra. Michele Dalla Bernardina pela confecção dos medicamentos empregados no presente estudo, meu cunhado Alexandre e meu sobrinho Gabriel, meu sogro Raul e minha sogra Maria do Socorro, pelo apoio incondicional, amo muito vocês.

A Cristina Zoucas, Cintia Lobo e Samantha pela total disponibilidade no decorrer dos anos do curso.

A bióloga Izilvânia Barreto pela verdadeira amizade e contribuição na

realização da parte experimental do presente estudo. Minha sempre paciente e confidente, e que Deus te ilumine sempre em seus caminhos.

Aos docentes da ESFA e SL MANDIC-VV e ABORVV por todo apoio e companheirismo, dificuldades, enfrentado as durante está minha jornada. Meu muito obrigado.

Ao professor e coordenador Dr. Eduardo Dias, pela sua amizade e ajuda na colaboração nas diversas fases desta pesquisa. Conte sempre comigo amigo.

Ao meu grande amigo Christian Spagnol, pela imensa ajuda e paciência durante todos esses anos de curso.

Ao coordenador de odontologia da ESFA Professor Dr. Carlos Roberto Roldi, pelo apoio e incentivo pleno no desenvolvimento da minha carreira acadêmica dentro da instituição.

EPÍGRAFE

“Paga-se mal a um mestre enquanto se permanece discípulo.”
(Carl Gustav Jung)

RESUMO

Há evidências de uma possível relação entre *Archaea* e infecções orais, incluindo periodontites; porém até o presente momento nenhum estudo avaliou as alterações na prevalência de espécies de *Archaea* após o tratamento periodontal. O objetivo do presente estudo duplo cego, aleatório e placebo controlado foi avaliar a possível influência da terapia periodontal (raspagem e alisamento radicular (RAR) somente ou associada à antibioticoterapia sistêmica – metronidazol e amoxicilina) na alteração da prevalência de *Archaea* em indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Desta forma, foram selecionados 30 indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada, distribuídos em dois grupos terapêuticos, sendo Grupo Controle: RAR + medicação placebo; e Grupo Teste: RAR + metronidazol (400mg) 3 vezes ao dia durante 14 dias (MTZ) + amoxicilina (500mg) 3x ao dia durante 14 dias (AMX). A RAR foi realizada em 14 dias e o uso dos antibióticos iniciou junto com os procedimentos de raspagem. Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados: índice de placa visível, índice de sangramento gengival, PS, NCI, sangramento à sondagem e supuração. Além disso, nove amostras de biofilme subgengival foram coletadas, sendo três em cada categoria de PS (≤ 3mm, 4-6 mm e ≥ 7mm), as quais permaneceram sob refrigeração a -80ºC até o processamento laboratorial. As amostras de DNA foram submetidas a reação de amplificação do gene 16S rRNA de *Archaea* segundo o primer descrito por Kulik *et al.* em 2001. As avaliações clínica e microbiológica foram realizadas no início do estudo e 180 dias pós-terapia. Os resultados demonstraram que todas as terapias reduziram significativamente todos os parâmetros clínicos avaliados, mas após 180 dias da terapia a média de boca-toda para a PS e NCI foi significativamente menor no grupo teste em comparação ao grupo controle (Teste U de Mann-Whitney, $p<0,05$). Ambos os grupos de tratamento reduziram significativamente a prevalência de indivíduos colonizados por *Archaea* em 180 dias pós-terapia (Qui-quadrado, $p<0,05$), sem diferenças significativas entre os grupos (Qui-quadrado, $p>0,05$). Apesar da associação do MTZ+AMX à RAR evidenciar os melhores benefícios clínicos, as duas terapias testadas reduziram igualmente a prevalência de *Archaea*, sendo que não foram observadas diferenças entre os grupos em 180 dias pós-terapia.

Palavras-chave: *Archaea*, periodontite agressiva generalizada, terapia periodontal.

ABSTRACT

There is evidence of a possible relationship between *Archaea* and oral infections including periodontitis; however, to date no study has assessed the changes in prevalence of *Archaea* species after periodontal treatment. The aim of this randomized double-blind and placebo-controlled study was to assess possible influence of the periodontal therapy (scaling and root planning [SRP]) alone or associated with systemic antibiotic therapy (metronidazole plus amoxicillin) on alteration of prevalence of *Archaea* in individuals with generalized aggressive periodontitis. Thus, 30 subjects with generalized aggressive periodontitis were selected and distributed into two therapeutic groups, being Control Group: SRP + placebo; and Test Group: SRP + metronidazole (400 mg) three times a day for 14 days (MTZ) + amoxicillin (500 mg) three times a day for 14 days (AMX). SRP was performed on 14 days and use of antibiotics began with scaling procedures. The following clinical parameters were evaluated: visible plaque index, gingival bleeding index, probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP) and suppuration (SUP). Moreover, nine subgingival plaque samples were collected, three in each PD categories (≤ 3 mm, 4-6 mm, and ≥ 7mm), which were kept under refrigeration at – 80°C until laboratory processing. The DNA samples were subjected to *Archaea* 16S rRNA gene amplification reaction according to the primer described by Kulik *et al.* em 2001. Clinical and microbiological examinations were performed at baseline and 180 days post-therapy. The results showed that all therapies led to a statistically significant decrease in all evaluated clinical parameters, however, at 180 days post-therapy the full-mouth mean DP and CAL values were significantly lower in test group compared with control group (Mann-Whitney *U*-test, $p < .05$). Both treatment groups significantly decreased the prevalence of subjects housing *Archaea* at 180 days post-therapy (Chi-square test, $p < .05$), with no significant differences among the groups (Chi-square test, $p > .05$). Despite the association of MTZ + AMX with SRP evidence the best clinical benefits, both therapies similarly decreased the prevalence of *Archaea*, with no differences among the groups at 180 days post-therapy.

Key-words: *Archaea*, generalized aggressive periodontitis, periodontal disease.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores analisados e condições para detecção microbiana..... 32

Tabela 2. Características demográficas e média (±DP) de boca-toda para os parâmetros clínicos no início do estudo e 180 dias pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos 37

Tabela 3. Média (±DP) de redução de boca-toda entre o início do estudo e 180 dias pós-terapia, para os parâmetros profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), nos dois grupos terapêuticos 38

Tabela 4. Freqüência (%) de detecção de *Archaea* em indivíduos dos dois grupos terapêuticos, no início do estudo e 180 dias pós-terapia..... 38

Tabela 5. Média da prevalência (%) de sítios colonizados por *Archaea* nos dois grupos terapêuticos, no início do estudo e 180 dias pós-terapia..... 39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

2.REVISÃO DE LITERATURA 14

2.1 Etiologia da periodontite agressiva 14

2.1.1 Associação entre o domínio Archaea e a doença periodontal.....17

2.2 Metronidazol combinado à amoxicilina.....21

3. PROPOSIÇÃO 26

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....27

4.1 Seleção de indivíduos.....27

4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....27

4.3 Delineamento experimental.....28

4.4 Avaliação clínica.....29

4.5 Avaliação microbiológica 30

4.6 Procedimentos terapêuticos 32

4.7 Análise estatística.....33

5 RESULTADOS 35

5.1 Resultados clínicos 35

5.2 Resultados microbiológicos 35

6 DISCUSSÃO 40

7 CONCLUSÃO 43

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....44

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal acomete as estruturas de proteção e sustentação dos dentes e tem como fator etiológico microrganismos específicos presentes na placa bacteriana supragengival e subgengival (Löe *et al.,* 1965; Socransky, 1970; Listgarten *et al.,* 1978; Loesche *et al.*, 1985; Socransky & Haffajee, 1994; Haffajee & Socransky, 1994; Socransky *et al.*, 1998). A comprovação da natureza infecciosa da doença periodontal foi demonstrada por Löe e colaboradores na década de 60 após o estudo clássico sobre a "gengivite experimental" que demonstrou a relação existente entre o acúmulo de placa dentária e a inflamação gengival (Löe *et al.*, 1965). O reconhecimento da especificidade da placa subgengival e da existência de diferentes formas de infecções periodontais associadas a diferentes patógenos (Loesche 1976; Socransky & Haffajjee, 1994), tem levado pesquisadores e clínicos a um melhor entendimento desse processo patológico e, eventualmente, à elaboração de terapias específicas, com maiores probabilidades de sucesso.

Neste contexto, a periodontite agressiva (PA) é uma infecção que acomete indivíduos sistemicamente saudáveis, normalmente jovens, caracterizada por uma severa perda de inserção clínica associada a uma rápida destruição óssea alveolar (Miller *et al.*, 1987; Tonetti & Mombeli, 1999; Armitage, 1999; Lang *et al.*, 1999). Esta forma de doença periodontal é classificada de maneira localizada ou generalizada, dependendo de sua extensão (Armitage, 1999; Lang *et al.,* 1999).

Existe um forte consenso na literatura quanto ao envolvimento da espécie bacteriana *Aggregactibater actinomycetemcomitans* (Norskov-Lauritsen *et al.*, 2006) anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, na etiopatogenia da PA (Slots *et al.*, 1980; Zambon, 1985; Schenkein *et al.*, 1993; Tinoco *et al.*, 1997, Cortelli *et al.*, 2005). Porém, poucos estudos avaliaram de forma sistemática a composição da microbiota subgengival de indivíduos brasileiros com essa forma de doença periodontite.

O advento de novas técnicas microbiológicas e o avanço na identificação de novas espécies de microrganismos vem demonstrando que alguns indivíduos portadores de PA não apresentam ou até apresentam baixas proporções de *A. actinomycetemcomitas* (Han *et al.*, 1991; Kamma *et al.*, 2001; Mullally *et al.*, 2000;

Lopez *et al.*, 1996; Trevilatto *et al.*, 2002; Kamma *et al.*, 2004). Além disso, outros patógenos estão sendo relacionados, tais como, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus* e *Fusobacterium ssp*. (Loesche *et al.*, 1985; Moore & Moore 1994; Mullally *et al.*, 2000; Kamma *et al.*, 2001; Faveri *et al.* 2008). Esses dados sugerem que outros microrganismos, como bactérias, vírus e espécies do domínio *Archaea* podem estar relacionadas com o início e a progressão desta infecção.

Nesse contexto, Colombo *et al.* (2002) e Silva-Boghossian *et al.* (2011) constataram a presença de espécies microbianas não encontradas com frequência na microbiota subgengival, por exemplo, *Acinetobacter baumannii*, *Bartonella* sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Esses microrganismos são relacionados a infecções sistêmicas e têm sido detectados na composição de biofilme bacteriano responsável pelas doenças periodontais; todavia, ainda não está claro o papel desses microrganismos na etiologia das periodontites.

Archaea é um grupo de microrganismos unicelulares que foram classificadas com base na sequência de genes ribossomais RNA como um grupo distinto de organismos, muito diferentes de bactérias e eucariontes (Kulik *et al.*, 2001; Lepp *et al.*, 2004; Yamabe *et al.* 2008).

Matarazzo *et al.* (2011) analisou os níveis, a diversidade e as proporções de *Archaea* em indivíduos com PA generalizada e saúde periodontal. Este estudo transversal demonstrou que microrganismos do domínio *Archaea* foram freqüentemente encontrados em indivíduos com saúde periodontal e PA generalizada, especialmente a espécie *Metanobrevibacter oralis*. Além disso, os níveis mais elevados e proporções (*Archaea* / procariotas totais) deste domínio foram observados no grupo de indivíduos com PA generalizada em comparação aos indivíduos com saúde periodontal, o que pode indicar um possível papel de espécies de *Archaea* como um modificador do ambiente em PA generalizada.

Embora existam evidências de uma possível relação entre *Archaea* e infecções orais, incluindo periodontites, até a presente data não temos conhecimento de estudos que avaliaram alterações na prevalência de espécies de *Archaea* após o tratamento periodontal (Leep et al. 2004)

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia da periodontite agressiva

A microbiota da doença periodontal agressiva é complexa, consistindo geralmente de bactérias anaeróbias Gram-negativas, tais como, *A.actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *C. rectus* e *Fusobacterium ssp.* (Loesche *et al.*, 1985; Moore & Moore 1994; Mullally *et al.*, 2000; Kamma *et al.*, 2001). O papel de bactérias específicas, especialmente *A. actinomycetemcomitans* na forma localizada da doença periodontal agressiva tem sido extensivamente estudado em adolescentes e adultos jovens (Zambon, 1985; Schenkein *et al.*, 1993; Tinoco *et al.*, 1997; Cortelli *et al.*, 2005). Slots *et al.* (1980) analisando por meio de cultura microbiana amostras de biofilme subgengival de bolsas profundas de pacientes portadores de doença periodontal agressiva localizada encontraram em 9 dos 10 indivíduos analisados uma alta prevalência de *A. actinomycetemcomitans.* Entretanto, os relatos da prevalência deste patógeno em indivíduos jovens saudáveis e portadores de doença periodontal crônica são menores, principalmente em estudos realizados no Brasil (Cortelli *et al.*, 2005 Tinoco *et al.*, 1997). Outros estudos isolaram *A. actinomycetemcomitans* em cerca de 75 a 100% de amostras de bolsas periodontais ativas na doença periodontal agressiva (Zambon *et al.*, 1983; Christersson *et al.*, 1985; Mandell & Socransky, 1981; Zambon *et al.*, 1985; Russo *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Cortelli *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005), corroborando assim a relação existente entre este patógeno e a forma agressiva da doença periodontal.

Embora *A. actinomycetemcomitans* seja indicado como principal patógeno na doença periodontal agressiva, existem algumas controvérsias na literatura (Han *et al.*, 1991; Kamma *et al.*, 2001; Mullally *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 2002; Trevilatto *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2003; Gajardo *et al.*, 2005) Kamma *et al.* (2001) estudando uma população na Grécia e Mullally *et al.* (2000) na Irlanda do Norte, observaram por meio da técnica do PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) uma baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans* (18,8 e 28%) em bolsas periodontais de indivíduos com doença periodontal agressiva localizada. Em

outro estudo, Han *et al.* (1991) não isolaram *A. actinomycetemcomitans* em nenhuma das 23 amostras subgengivais obtidas de indivíduos chineses portadores da forma agressiva da doença periodontal. Trevilatto *et al.* (2002) estudaram uma família brasileira com doença periodontal agressiva (n=14) e relataram uma baixa prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, questionando assim o valor do isolamento e a presença deste microrganismo como forma de diagnóstico (etiologia) para a doença periodontal agressiva. Recentemente, Gajardo *et al.* (2005) por meio de cultura microbiana isolaram *A. actinomycetemcomitans* em apenas 19,4% de bolsas periodontais de 30 indivíduos com doença periodontal agressiva em uma população chilena. Esta baixa prevalência de *A*. *actinomycetemcomitans* na população chilena já havia sido reportada por Lopez *et al.* (1996). Complementando, Mombelli *et al.* (2002), em uma revisão sistemática da literatura, relataram que a presença ou ausência de *A. actinomycetemcomitans* não pode ser um parâmetro para diferenciar indivíduos com doença periodontal agressiva e com a forma crônica da doença.

Ximenez-Fyvie *et al.* (2006) se propuseram a determinar a composição microbiana de amostras de placa subgengival de pacientes mexicanos com periodontite agressiva generalizada não tratados (n=19), os quais foram comparados com pacientes que apresentavam periodontite crônica generalizada (n = 39) e outros (n = 19) que gozavam de boa saúde periodontal. Utilizando a técnica *checkboard DNA-DNA hybridization* para detectar as espécies microbianas na placa subgengival, os autores notaram que todos os grupos de pacientes tinham os maiores níveis e proporções de *Actinomyces naeslundi 1, Actinomyces viscosus, Corynebacterium matruchotii, Peptostreptococcus micros* e *Veillonella parvula,* Os grupos de pacientes com periodontite não apresentaram diferenças significativas quanto aos níveis de *Actinomyces israelli, Campylobacter showae, Neisseria mucosa, Porphyromonas endodontalis, Propionibacterium acnes, Selenomonas artemidis, Selenomonas noxia*, *Streptococcus anginosus, Streptococcus constellatus, Streptococcus gordonii, Streptococcus intermedius* e *Streptococcus mitis*. Porém, em relação aos pacientes saudáveis, os pacientes com ambos os tipos de periodontite abrigavam significativamente maiores níveis e/ou proporções de *P.gingivalis, T.forsythia, Prevotella nigrescens* e espécies do complexo vermelho,

sem diferenças entre ambos os grupos de periodontite. Uma constatação interessante desse estudo foi que o microrganismo *A.actinomycetemcomitans* esteve entre as espécies que representou a menor proporção nas amostras de pacientes com periodontite agressiva generalizada e dos pacientes saudáveis. Além disso, todos os pacientes com periodontite agressiva generalizada portaram *P.nigrescens* e *P.gingivalis*. Os autores concluíram que as diferenças microbianas entre os grupos de periodontite foram apenas discretas e nenhuma das bactérias testadas permitiu diferenciar o perfil microbiano subgengival de um ou outro grupo de periodontite.

Botero *et al.* (2007), tendo como uma amostra uma população de pacientes colombianos com periodontite crônica e agressiva, avaliaram a ocorrência de patógenos periodontais e bactérias superinfectantes utilizando o método de detecção PCR. Nos pacientes com periodontite agressiva e naqueles com periodontite crônica foram encontradas as espécies orais *P. gingivalis, T. forsythia* e *Eikenella corrodens*, com mais frequência nos indivíduos com periodontite agressiva. Todavia, um achado importante foi presença de altos níveis de microrganismos incomuns, por exemplo, os organismos da família *Enterobacteriaceae*, que são encontrados com mais frequência no sistema digestivo de seres humanos e animais, e alguns deles exercem papel oportunista em infecções em seres humanos. Os autores recomendaram cautela ao interpretar a presença de bastonetes entéricos subgengivais, uma vez que seu papel na doença periodontal destrutiva ainda não foi elucidado.

Fritschi, Abert-Kiszely e Persson (2008) realizaram um estudo transversal onde testaram microbiologicamente a hipótese de que não havia nenhuma diferença microbiológica subgengival entre indivíduos com um diagnóstico de periodontite agressiva ou crônica, ou pela condição de tabagismo. Utilizando uma amostra de 106 indivíduos (84 com periodontite crônica e 22 com periodontite agressiva), dos quais 30 eram fumantes, constataram que, independentemente de ser ou não fumante, a espécie *S. aureus* (agente causador de infecções médicas graves) esteve presente, mas com alta prevalência em indivíduos não fumantes com periodontite agressiva. Isso não indicou que esse patógeno seja o agente etiológico infecciosa de periodontite, uma vez o estudo não proporcionou evidência suficiente

de que ele esteja associado à periodontite, sendo necessários, portanto, mais estudos microbiológicos a serem realizados antes e depois da terapia periodontal para confirmar os resultados desse estudo.

A composição microbiana subgengival da PA foi avaliada por Faveri *et al.* (2009). Foram selecionados 120 indivíduos, sendo 15 com PA localizada, 25 com PA generalizada, 30 com periodontite crônica e 50 com saúde periodontal submetidos a exame clínico e avaliação microbiológica. Nove amostras de placa subgengival foram coletadas de cada sujeito e analisadas por meio da técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization* em relação a 38 espécies bacterianas. Os autores observaram que as espécies do complexo vermelho e algumas do complexo laranja são os patógenos periodontais mais numerosos e prevalente ma PA localizada. As proporções de *A.aggregatibacter* estavam elevadas em sítios rasos e intermediários em comparação aos sítios de indivíduos com PA generalizada ou saudáveis. Essa espécie também apresentou uma correlação negativa com a idade e com as proporções de complexo vermelho. Além disso, as espécies consideradas benéficas estavam reduzidas na PA localizada. Em conclusão, os autores sugeriram que *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Treponema denticola*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *P. intermedia* podem desempenhar um papel importante na progressão da periodontite agressiva.

Logo, estes estudos sugerem que outros microrganismos podem estar associados à etiologia da doença periodontal agressiva.

2.1.1 *Associação entre o domínio Archaea e a doença periodontal*

Estima-se que a cavidade bucal albergue aproximadamente 600-700 espécies de bactérias (Paster *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2005; Socransky & Haffajee, 2005, Faveri *et al.* 2008), além da presença de espécies de fungos, vírus e mais recentemente, microrganismos do domínio *Archaea* (Kulik *et al.*, 2001; Lepp *et al.*, 2004; Yamabe *et al.* 2008). Assim, o entendimento da associação entre determinados microrganismos e as doenças periodontais é dificultada pela necessidade da análise da microbiota como um todo, visto que estas doenças são provocadas por um desequilíbrio da relação intermicrobiana no sítio subgengival ou

da relação entre a microbiota e o hospedeiro. Assim sendo, atualmente existe a percepção do próprio homem como um “supraorganismo”, compreendendo a soma de *Homo sapiens* e dos microrganismos que compõe a sua microbiota residente, formando uma estrutura metabólica que soma os atributos humanos e microbianos. Estes microrganismos pertencem aos três domínios de vida - *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* - e suplantam as células humanas em uma ordem de magnitude. Assim, o conhecimento da microbiota é essencial para o conhecimento do próprio homem. Grandes esforços estão sendo feito atualmente, como o projeto internacional do microbioma humano, visando analisar a microbiota do intestino na saúde e doença (Turnbaugh *et al.*, 2007). Outras superfícies do corpo humano, particularmente as superfícies mucosas como a cavidade bucal, são também densamente colonizadas e devem ser analisadas com maior magnitude.

Como descrito anteriormente, a microbiota do homem é formada por organismos dos domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*, porém poucos estudos analisaram o domínio *Archaea*. Representantes do domínio *Archaea* foram recentemente associados à doença periodontal (Kulik *et al.*, 2001; Lepp *et al.*, 2004; Yamabe *et al.* 2008) e as doenças peri-implantares (Gonçalves *et al.* 2010). *Archaea* são microrganismos procariontes distintos de bactérias, com diferentes propriedades metabólicas, devido às características de organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia (Woese *et al.*, 1990). Apesar de este domínio ter sido primeiramente isolado de ambientes com condições extremas, como elevada temperatura, alta salinidade e baixíssimos pHs, foi observada a sua ampla distribuição na natureza, inclusive sendo capazes de viver com eucariotos, em relações simbiontes. Na última década foi demonstrado que *Archaea* são capazes de colonizar e sobreviver em humanos em coexistência com a microbiota endógena (Cavicchioli *et al.* 2003; Eckburg *et al.* 2003, Gonçalves *et al.* 2010). Apesar da onipresença de *Archaea* na natureza e da íntima associação com humanos, nenhum organismo do domínio *Archaea* foi considerado patogênico até o presente momento (Yamabe *et al.*, 2008, Horz & Conrads 2011). No entanto, a proporção de *Archaea* em relação aos domínios *Eucarya* e *Bacteria* pode exercer algum papel patogênico, visto que o potencial para formar relações simbióticas, mutualísticas ou patogênicas pode ser direcionado pelas oportunidades criadas através de interações estáveis e

altamente densas (Cavicchioli *et al.*, 2003; Eckburg *et al.*, 2003).

Foram identificados na microbiota intestinal (Scanlan *et al.*, 2008), oral (Kulik et al, 2001; Leep *et al.* 2004; Vianna *et al.* 2008; Yamabe *et al.*, 2008, Matarazzo *et al.* 2011, Faveri *et al.* 2011) e vaginal humana (Belay *et al.*, 1990, Eckburg *et al.*, 2003) organismos *Archaea* metanogênicos, ou seja que apresentam a propriedade de consumir o hidrogênio (H_2) e o dióxido de carbono (CO_2), para a produção de metano. Também foi sugerido que *Archaea* sejam necessárias e fundamentais em certos nichos anaeróbicos para manter um equilíbrio bioquímico desejável no microambiente (Vianna *et al.*, 2006). Por exemplo, a ausência relativa de oxidantes de metano comparado com o número de bactérias redutoras de sulfato na microbiota intestinal humana com o resultante aumento de sulfeto de hidrogênio poderia contribuir para o desenvolvimento de doença (Scanlan *et al.*, 2008). Por outro lado, alguns estudos tentam vincular a presença de metanogênicos e o desenvolvimento de doenças de causa ainda desconhecida (Kulik *et al.*, 2001; Cavichiolli *et al.*, 2003; Eckburg *et al.*, 2003; Lepp *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2006; Yamabe *et al.*, 2008). Como estas doenças representam um processo dinâmico no qual várias espécies microbianas dominam em diferentes fases da infecção devido às mudanças na disponibilidade nutricional, nível de oxigênio e pH local, os estudos sugerem que os *Archaea* metanogênicos indiretamente poderiam promover a doença pelo consumo de hidrogênio, assim permitindo a proliferação de fermentadores secundários a níveis superiores ao limite possível na sua ausência (Lepp *et al.*, 2004; Scanlan *et al.*, 2008).

O interesse nas populações metanogênicas da cavidade bucal está embasado na possível associação dos metanogênicos e a produção de metano com a ocorrência de halitose, doença periodontal e infecção endodôntica (Kulik *et al.*, 2001; Robichaux *et al.*, 2003; Lepp *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2006; Vickerman *et al.*, 2007; Yamabe *et al.*, 2008). Membros do gênero *Methanobrevibacter* são anaeróbios estritos, produtores de metano, que se favoreceriam da condição de anaerobiose presente no biofilme dental (Lepp *et al.,* 2004), sendo que *Methanobrevibacter oralis* é a espécie de *Archaea* predominante na cavidade bucal (Kulik *et al.*, 2001; Lepp *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2006; Vickerman *et al.*, 2007; Yamabe *et al.*, 2008, Matarazzo *et al.*, 2011). Na doença periodontal crônica alguns

estudos observaram a presença de *Archaea* em amostras de biofilme subgengival e procuraram estabelecer uma relação entre a presença de doença e estes organismos. Kulik *et al.* (2001) detectaram *rRNA* de *Archaea* em 77% das amostras de biofilme subgengival coletada de pacientes em diferentes condições de doença periodontal. Estes resultados foram recentemente corroborados por Li *et al.* (2009), onde os autores relataram uma prevalência de 73,2% de *Archaea* no ambiente subgengival de indivíduos com doença periodontal crônica. Lepp *et al.* (2004) avaliaram amostras de biofilme subgengival de pacientes saudáveis e com periodontite crônica e não foi detectados membros do domínio *Archaea* em nenhuma das amostras da população controle saudável, mas 36% dos pacientes periodontais albergavam estes microrganismos. Li *et al.* (2008) analisaram amostras de biofilme subgengival de 23 indivíduos com doença periodontal agressiva, 29 com doença periodontal crônica, 35 com gengivite e 38 indivíduos com saúde periodontal. Os autores relataram uma prevalência de 65%, 72%, 26% e 0%, respectivamente.

A detecção de microrganismos do domínio *Archaea* em amostras de biofilme subgengival de pacientes com periodontite e ausência de estudos comparando simultaneamente a prevalência desses microrganismos em indivíduos com periodontite crônica e agressiva e correlacionando os resultados com o aumento de profundidade de sondagem levaram Fermiano *et al.* (2011) a realizar um estudo suprindo tal lacuna. Para isso, selecionaram 45 indivíduos que apresentavam periodontite agressiva (n = 15), periodontite crônica (n = 15) e com saúde periodontal (n = 15), a que foram submetidos a exames clínicos avaliando-se índice de placa gengival, índice de sangramento gengival, profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, sangramento à sondagem e supuração. Dos pacientes com periodontite foram coletadas amostras de biofilme subgengival, enquanto dos pacientes saudáveis periodontalmente foram obtidas amostras de biofilme supragengival, das quais foi extraído o DNA e posteriormente submetidas a uma reação de PCR para amplificação da região 16S rRNA de *Archaea.* Os microrganismos do domínio *Archaea* foram detectados em 73,3% dos indivíduos com periodontite crônica, 60% dos indivíduos com periodontite agressiva, e 80% dos indivíduos com saúde periodontal, os quais apresentaram prevalência de amostras

positivas para a presença de *Archaea*, respectivamente, de 15,5%, 28,8%, e 31,8%, sem diferenças significativas entre os grupos. Também não foi observada nenhuma correlação entre a presença de *Archaea* e as diferentes categorias de profundidade de sondagem. Esses resultados levaram os autores a afirmarem que a contribuição de *Archaea* para a patogênese da doença periodontal em humanos não está clara e ainda deve ser questionada. Concluíram que os microrganismos do domínio *Archaea* são muito prevalentes no biofilme subgengival, independentemente da condição periodontal, o que sugere ausência de associação entre a detecção de *Archaea* e a etiologia das periodontites.

Desta forma, as conclusões destes estudos sugerem que microrganismos do domínio *Archaea*, especialmente o *Methanobrevibacter oralis*, podem ser implicados na etiologia das doenças periodontais.

2.2 Metronidazol combinado à amoxicilina

Em 1928, Alexander Fleming, enquanto trabalhava com variantes de estafilococos em laboratório, observou que um fungo – pertencente ao gênero Penicillium - promovia uma inibição no crescimento bacteriano. Após ser isolado em cultura pura, esse fungo produziu uma substância antibacteriana, a penicilina, que posteriormente foi extraída e seus efeitos antibacterianos analisados (Florey *et al.*, 1945; Chain, 1948). Constatou-se que a penicilina possuía poderosas propriedades quimioterápicas em camundongos infectados e que era atóxica (Hare, 1970).

As penicilinas agem inibindo a síntese da parede celular, resultando em uma célula bacteriana instável na osmolaridade dos líquidos orgânicos. As penicilinas constituem-se na primeira opção como coadjuvantes no tratamento das infecções odontológicas leves e moderadas. Dentre as penicilinas, a amoxicilina tem um amplo espectro de atividade contra espécies anaeróbias estritas e facultativas subgengivais (Walker *et al.*, 1985; Kulik *et al.*, 2001). Atua sobre microrganismos cocos e bacilos Gram-negativos devido à capacidade de penetrar nas barreiras lipídicas e na parede celular mais complexa desses microrganismos, agindo sobre as enzimas situadas na parte externa da membrana celular bacteriana lipoprotéica

(Montgomery, 2000).

As características benéficas individuais da amoxicilina e do metronidazol e a possível complementariedade de ação farmacológica para a cura da doença periodontal tem levado pesquisadores a associar ambas as medicações como uma terapia adjunta a terapia mecânica, com o objetivo de suprimir ou eliminar os patógenos envolvidos com a doença e obter melhores resultados em longo prazo. Entretanto, até o presente momento, a literatura está escassa em informações sobre esta combinação antibiótica.

A destruição dos tecidos periodontais está fortemente associada à presença de vários patógenos periodontais. Um destes microrganismos é o *A. actinomycetemcomitans*. A periodontite agressiva (Slots *et al.*, 1980; Mandell & Socransky, 1981; Mandell *et al.*, 1987) e a periodontite crônica (Bragd *et al.*, 1987) estão associadas a presença do *A. actinomycetemcomitans*, sendo conseqüência da sua supressão uma melhor resposta periodontal (Van Winkelhoff *et al.*,1989 e 1992).

Pavicic *et al.* (1994) avaliaram a presença do *A. actinomycetemcomitans* subgengivalmente, na mucosa julgal, tonsila e na saliva após dois anos da terapia mecânica associada ao metronidazol (250mg, 3x/dia, 7 dias) e amoxicilina (375mg, 3x/dia, 7 dias) sistêmicos. Observaram resultados negativos para a presença do *A. actinomycetemcomitans* em 47 dos 48 indivíduos do estudo, além de reduções na profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, índice de placa, sangramento à sondagem em 3 e 24 meses após terapia ativa, sugerindo que esta terapia pode ser efetiva para a supressão do *A. actinomycetemcomitans* por um longo período de tempo.

López *et al.* (1998) avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos da amoxicilina (500mg, 3x/dia, 7 dias) e do metronidazol (250mg, 3x/dia, 7 dias) sistêmicos como uma única terapia em indivíduos portadores de periodontite crônica moderada e avançada que apresentaram pelo menos dois sítios com $\geq$ 2mm de perda de inserção clínica. Constataram que o percentual dos sítios sangrantes diminuiu significantemente 2 e 4 meses após a terapia. Nos mesmos intervalos de avaliação, o nível clínico de inserção foi significantemente melhor nos indivíduos tratados com os antibióticos, que também apresentaram redução de sítios com *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

Ainda nesta linha de pesquisa, em 2000, López *et al.* empregaram a mesma terapia em indivíduos com as mesmas condições do estudo anterior, alterando-se apenas o regime antibiótico, que foi repetido após 4 e 8 meses, porém avaliando-se apenas parâmetros clínicos. Constatou-se que, a partir do 2º mês de avaliação, a terapia antibiótica melhorou significativamente o ganho de inserção (0,43mm; p=0,005), diminuiu os sítios ativos (p<0,03), aumentou os sítios que ganharam inserção clínica (p<0,01), reduziu a profundidade de sondagem (p<0,00006) e diminuiu o percentual de sangramento à sondagem (p<0,0005).

Winkel *et al.* (2001) avaliaram clínica e microbiologicamente indivíduos com periodontite crônica generalizada avançada, submetidos a apenas tratamento mecânico de raspagem e alisamento radicular (RAR) ou ao mesmo procedimento, porém, associado ao uso sistêmico do metronidazol (250mg, 3x/dia, 7 dias) e da amoxicilina (375mg, 3x/dia, 7 dias). Os autores constataram que o a associação de terapias proporcionou maiores reduções na profundidade de sondagem e maior ganho de inserção clínica nos sítios que eram inicialmente ≥ 7mm, bem como reduziu o número de *P. gingivalis, T. forsythia* e *P. intermedia.*

Já em 2006, López *et al.* selecionaram indivíduos com pelo menos seis sítios com profundidade de sondagem ≥ 4mm e perda de inserção ≥ 3mm que foram divididos em dois grupos: teste (metronidazol - 250mg, 3x/dia, 7 dias, e amoxicilina - 500mg, 3x/dia, 7 dias, como terapia única) e controle (RAR). Após a realização de exame clínico e microbiológico por meio do teste *checkerboard DNA-DNA hybridization*, no início, 3, 6, 9 e 12 meses, evidenciou-se que as duas terapias promoveram melhoras, e as alterações nos parâmetros clínicos e microbiológicos foram semelhantes entre ambos os grupos.

Moeintaghavi *et al.* (2007) estudaram a amoxicilina (500mg, 3x/dia, 7 dias) e o metronidazol (250mg, 3x/dia, 7 dias) sistêmicos como coadjuvantes ao tratamento da periodontite crônica. O estudo foi aleatorizado, duplo cego, paralelo e placebo. Os parâmetros clínicos realizados foram profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, índice de placa, sangramento à sondagem. Os sítios ≥ 5mm foram selecionados para a análise microbiológica. Os resultados demonstraram diferenças estatísticas nos parâmetros clínicos entre o grupo teste e o grupo controle. Paralelamente as mudanças clínicas, houve uma redução significativa no

número dos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia,* no grupo teste, em relação aos dados iniciais. Após a terapia havia diferenças estatísticas entre o grupo teste e controle em número de indivíduos negativos para *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis* e *P. intermedia* (p=0,033).

O recente estudo de Matarazzo *et al.* (2008) avaliou clínica e microbiologicamente indivíduos fumantes com periodontite crônica, tratados de três modos: RAR somente, RAR associada ao metronidazol ou RAR associada ao metronidazol e amoxicilina combinados. O grupo que recebeu os dois antibióticos associados apresentou as maiores reduções de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, bem como um aumento mais expressivo das proporções das espécies benéficas e maior redução dos patógenos.

Recentemente, Cionca *et al.* (2009), avaliaram os benefícios clínicos ocorridos em pacientes com periodontite crônica tratados com administração de amoxicilina (375mg, 3x ao dia/ 7dias) e metronidazol (500mg, 3x ao dia/ 7dias) após a RAR realizada dentro de 24hs, complementada com irrigação das bolsas periodontais com clorexidina 0,1% e controle químico do biofilme supragengival por meio de bochecho (clorexidina 0,2% 2x ao dia/ 10dias). Os autores observaram que seis meses após as terapias o grupo que combinou os antibióticos à RAR reduziu a necessidade de intervenções adicionais para o tratamento da doença comparado ao grupo que recebeu apenas RAR em 24hs.

Mestnik *et al.* (2010) avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos da RAR somente ou em combinação com metronidazol (400 mg 3 x por dia) e amoxicilina (500 mg 3 x por dia) no tratamento de 30 indivíduos com PA generalizada. Os exames clínicos e microbiológicos, estes pela técnica Checkerboard DNA-DNA hybridization, realizados no início e 3 meses pós-RAR, evidenciaram que os indivíduos que receberam metronidazol e amoxicilina apresentaram as maiores melhoras na média de profundidade de sondagem e de nível clínico de inserção em sítios inicialmente intermediários e profundos, bem como as alterações mais benéficas no perfil microbiano, com proporções mais baixas de complexo vermelho e de complexo laranja após o tratamento. A terapia com antibióticos também reduziu os níveis *de A.aggregatibacter* em sítios inicialmente profundos.

Goodson *et al.* (2012) compararam os efeitos da RAR como terapia única ou associada à antibioticoterapia local com fibra de tetraciclina (T), ao metronidazol (MTZ) + amoxicilina (AMX), ou ao tratamento cirúrgico (C). Dois anos depois da aplicação das terapias, evidenciou-se que, quando associada a outras terapias, a RAR levou a melhores resultados clínicos do que quando realizada sozinha. Aparentemente a associação de mais de duas terapias não gerou benefícios sinérgicos e os melhores benefícios foram observados quando a RAR foi associada à antibióticoterapia sistêmica, associada ou não tetraciclina local ou ao tratamento cirúrgico.

Apesar dos estudos mostrarem evidentes resultados positivos sobre a associação do metronidazol e da amoxicilina como coadjuvante à RAR no tratamento da periodontite crônica, o momento de iniciar a administração das drogas (metronidazol/amoxicilina) ainda está controverso na literatura. Watts *et al.* (1986) e Walsh *et al.* (1986), embasados no conceito de que a escolha do protocolo terapêutico de antibioticoterapia iniciada junto com a RAR visa à disponibilidade da droga no ambiente subgengival pelo máximo de tempo possível em que a RAR estiver sendo realizada, demonstraram que a terapia com metronidazol não concomitante à RAR promovia um efeito limitado e transitório nos parâmetros clínicos e microbiológicos. Por outro lado, alguns autores (Jenkins *et al.*, 1989; Loesche *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2005; Kaner *et al.*, 2007a, 2007b) sugerem o uso da terapia antibiótica iniciada após a terapia mecânica de RAR, pois acreditam que neste momento a carga microbiana já está reduzida e assim o efeito da droga pode ser potencializado.

Chambrone et al. (2010), ao avaliarem os fatores que influenciam a perda dentária durante a manutenção periodontal ao longo de 5 anos, constataram que fatores relacionados ao paciente, por exemplo, a idade e o tabagismo, e fatores relacionados ao dente, a saber, tipo, localização e prognóstico do dente, estavam associados à perda dentária. Recomendaram que os pacientes devem instruídos a seguir um programa de manutenção periodontal periódica e a interromperem o tabagismo. Essa terapia, que também é recomendada pela Academia Americana de Periodontita, visa evitar a reincidência da doença periodontal e diminuir a mortalidade dentária.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a terapia periodontal (raspagem e alisamento radicular somente ou associada à antibioticoterapia sistêmica – metronidazol e amoxicilina) na alteração da frequência de *Archaea* em indivíduos com periodontite agressiva generalizada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção de indivíduos

Foram selecionados para a participação no estudo 30 indivíduos portadores de periodontite agressiva generalizada, com idade igual ou inferior a 30 anos que comparecerem no Centro de Estudos Clínicos da Universidade Guarulhos.

A seleção foi feita por um examinador previamente treinado e calibrado. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas, coletas, terapias e o caráter voluntário do estudo. Os que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e receberam a terapia periodontal gratuitamente. Além disso, os que necessitavam tiveram auxílio de transporte e alimentação estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução n° 196/96). Todas as informações e explicações sobre o estudo contempladas no TCLE foram transmitidas aos participantes pelos pesquisadores envolvidos no estudo. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos.

4.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

Para a inclusão no estudo, a seleção dos participantes respeitou os seguintes critérios (Armitage 1999):

- Voluntários portadores de periodontite agressiva generalizada, isto é, clinicamente saudáveis, exceto pela periodontite, ausência de condições sistêmicas, rápida perda de inserção (principalmente a proximal) e de destruição óssea.
- Idade igual ou inferior a 30 anos;
- Possuir um mínimo de 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Mínimo de três dentes incisivos permanentes e/ou primeiros molares com pelo menos um sítio de cada dente com profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI) > 5 mm e, mínimo de seis outros dentes além dos primeiros

molares e incisivos com pelo menos um sítio de cada dente com PS e NCI > 5 mm;

- Agregação familiar (pelo menos outro membro da família apresentando ou com história de doença periodontal).

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão de pacientes foram os seguintes:

- Fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos.
- Gestantes ou lactantes;
- Histórico de tratamento periodontal prévio nos últimos seis meses;
- Histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- Doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento;
- Reabilitações protéticas extensas;
- Relato de alergia aos medicamentos (metronidazol, amoxicilina e/ou clorexidina).

4.3 Delineamento experimental

No início deste estudo duplo cego, aleatorizado, placebo controlado, todos os indivíduos (n=30) foram submetidos à anamnese, exame clínico periodontal e coleta de amostras de biofilme subgengival dos sítios selecionados (ver 4.5.1 Seleção dos sítios-testes).

Em seguida, um pesquisador não envolvido diretamente no estudo fez a distribuição aleatória dos indivíduos, por meio de uma tabela de números equiprováveis, em dois grupos terapêuticos (n=15/grupo):

- Grupo controle (C): RAR + amoxicilina placebo (3x/dia, 14 dias) + metronidazol placebo (3x/dia, 14 dias) + bochecho com clorexidina 0,12% (2x/dia, 60 dias);
- Grupo teste (T): RAR + metronidazol 400mg (3x/dia, 14 dias) + **amoxicilina 500mg** (3x/dia, 14 dias) + bochecho com clorexidina 0,12% (2x/dia, 60 dias).

Inicialmente, todos os indivíduos participantes do estudo receberam

raspagem supragengival e instrução de higiene oral. A antibioticoterapia (metronidazol, amoxicilina e placebos) e o controle químico (clorexidina 0,12%) foram iniciados no mesmo dia da terapia básica de RAR, que foi realizada em 6 sessões e finalizada em 14 dias. A medicação sistêmica também teve duração de 14 dias, enquanto o controle químico foi utilizado por 60 dias. A avaliação clínica e a coleta microbiológica foram repetidas na consulta de reavaliação de 180 dias após o término do tratamento.

4.4 Avaliação clínica

Um examinador realizou todas as medições clínicas. A metodologia utilizada para a calibração foi preconizada por Araújo *et al.* (2003), que avaliaram o erro padrão da medida (e.p.m.) e o erro médio percentual (e.m.p.) para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (PS e NCI). O e.p.m e o e.m.p variaram entre 0,19mm-0,30mm e 2,0%-4,6%, respectivamente. Para as variáveis categóricas considerando a presença ou ausência do parâmetro clínico, foi realizada a média do nível de concordância, obtendo-se concordância superior a 92% (Teste Kappa).

As mensurações clínicas foram realizadas no início do estudo e 180 dias pós-terapia, em seis sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares) utilizando-se sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15 HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os parâmetros clínicos avaliados incluíram:

- Índice de Placa Visível - (IPV) (Ainamo & Bay, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa supra gengival visível;
- Índice de Sangramento Gengival - (ISG) (Ainamo & Bay, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento da gengiva marginal, após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival;
- Profundidade de Sondagem - (PS): distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;
- Nível Clínico de Inserção - (NCI): distância, em milímetros, entre a junção cemento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;

- Sangramento à Sondagem - (SS): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento, após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada;
- Supuração - (SUP): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de SUP espontânea ou após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada.

4.5 Avaliação microbiológica - Análise da prevalência de microrganismos do domínio *Archaea* por reação em cadeia da polimerase

4.5.1 Seleção dos sítios-testes

Foram selecionados nove sítios não-contíguos em cada indivíduo, distribuídos preferencialmente em quadrantes distintos, de acordo com a profundidade de sondagem inicial nas seguintes categorias: três sítios rasos (PS ≤ 3mm), três sítios intermediários (PS 4-6 mm), e três sítios profundos (PS ≥ 7mm). Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados. As amostras de biofilme foram coletadas no início do estudo e 180 dias pós-terapia.

4.5.2 Coleta das amostras de biofilme

Após a remoção do biofilme supragengival, amostras de biofilme subgengival foram coletadas por meio de curetas Gracey do tipo minifive 11-12 estéreis, posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único golpe tracionadas no sentido ápico-coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 50µL de solução tampão TE pH 7,6 (10 mM Tris-HCL - Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; 1 mM EDTA - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil). Esses tubos plásticos foram previamente identificados com o código do indivíduo, data e sítio, e após a coleta foram imediatamente armazenados sob refrigeração a -80ºC até o processamento microbiológico Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da Universidade Guarulhos.

4.5.3 Extração de DNA

O DNA das amostras de biofilme subgengival que foram extraídos de acordo com a metodologia descrita por Dewhirst *et al.* (2000). Para a lise das células, as amostras subgengivais foram diretamente suspensas em 50ul de TE e 0,5% de Tween-20. Proteinase K (200 mg/ml) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) também foi adicionada à solução. As amostras foram então incubadas a 55°C durante 2 horas e a proteinase K foi inativada por aquecimento a 95°C durante 5 min.

4.5.4 Reação de amplificação da região 16S rRNA de Archaea

As amostras de DNA foram submetidas a reação de amplificação do gene 16S rRNA de *Archaea* segundo o primer descrito por Kulik *et al.* na Tabela 1 (2001). Desta forma, para a reação de amplificação foram utilizados 1µl do DNA molde, $MgCl_2$ na concentração final 2mM, dNTP na concentração final 10mM, 5µl de tampão de PCR 10X, 25pmol de cada primer, 2 U de *Platinum*® *Taq* DNA Polimerase e água miliQ estéril, para um volume total de 50µl de reação. As reações de amplificação foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94ºC por 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95ºC por 15s, anelamento a 64ºC por 30s e extensão a 72ºC por 15s, e extensão final a 72ºC por 7 minutos em termociclador (Gen Amp PCR System 2400, Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Como controle positivo foi utilizado como molde um *pool* de DNA de *Archaea* metanogênicas (*Methanosaeta concilli*, *Methanosaeta lacustris*, *Methanobrevibacter arboriphilus* e *Methanobrevibacter smithii*) cedido pela Profa. Dra. Vivian Pelizzari do Laboratório de Microbiologia Ambiental do ICBII/USP.

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris Acetato EDTA (TAE, Tris acetato a 40mM, ph 8,5; EDTA a 2mM) e corados com Syber Safe (Invitrogen). Os fragmentos específicos contendo 654 pb foram visualizados e documentados sob luz ultravioleta.

Tabela 1. Iniciadores analisados e condições para detecção microbiana.

Referência	Seqüência nucleotídica	Anelamento (ºC)	Produto (pb)
Kulik *et al.* (2001)	300fEyAr5'-AGCRRGAGCCCGGAGATGG3' 954rEyAr 5'-CGGCGTTGARTCCAATTAAAC-3'	64	654

A temperatura de anelamento indica a adaptação a partir da referência listada.

4.6 Procedimentos terapêuticos

4.6.1 Terapia periodontal básica (RAR)

Após o registro das medidas clínicas e coleta de biofilme subgengival para a análise microbiológica, todos os indivíduos foram submetidos a sessões de adequação do meio bucal que incluíram instrução de higiene bucal (IHB), raspagem supragengival de todos os dentes (RSP) com instrumentos manuais e ultrasônicos, desgaste de restaurações em excesso, selamento provisório das lesões cariosas cavitadas, curativos endodônticos e exodontias. Durante as sessões de instrução de higiene bucal, os indivíduos foram orientados a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental Colgate Total® (Anacol Ind. E Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Em seguida, os indivíduos receberam seis sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy) sob anestesia local. Estas sessões de RAR foram realizadas por dois profissionais treinados e experientes, com duração de aproximadamente 1 hora e foram realizadas em no máximo 14 dias, sendo que os sítios mais comprometidos foram tratados com prioridade.

O examinador que realizou os exames clínicos e microbiológicos foi diferente daqueles que realizaram o tratamento (RAR).

As necessidades adicionais de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da Clínica Odontológica da Universidade Guarulhos.

4.6.2 Administração de metronidazol e amoxicilina

Indivíduos do grupo teste foram submetidos ao procedimento de RAR e à administração de 1,2 g/dia de metronidazol (400mg de 8/8 hs) combinado com 1,5 g/dia de amoxicilina (500mg de 8/8 horas) via oral por 14 dias, iniciada junto com a RAR. Os indivíduos do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém receberam comprimidos de placebo (3x/dia, durante 14 dias).

Os antibióticos e os placebos foram manipulados especialmente para este estudo em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Guarulhos. Todas as cápsulas (medicação ou placebo) apresentaram a mesma coloração e tamanho, e foram estocados em frascos plásticos leitosos, devidamente codificados. Quanto ao controle da ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, os indivíduos foram orientados a retornar na próxima semana à Clínica de Odontologia-UnG, trazendo o frasco vazio. Além disso, também foram monitorados de 4 em 4 dias, pessoalmente ou via telefone.

4.6.3 Administração de bochecho de clorexidina

Os bochechos (solução de digluconato de clorexidina 0,12%) foram realizados 2 vezes ao dia com 15 ml da solução, 40 minutos após a escovação. O início do uso da clorexidina ocorreu juntamente com o início da RAR e prosseguiu por 60 dias. As soluções foram manipuladas especialmente para o estudo, na farmácia de manipulação Pharmédica (São Paulo, SP, Brasil) e acondicionadas em frascos de 210ml idênticos e codificados. Os indivíduos receberam 1 frasco por semana contendo a solução de clorexidina. Após o término do produto, os indivíduos foram orientados a trazerem à Clínica de Odontologia da UnG o frasco vazio para a retirada de um novo frasco, para controle da cooperação.

4.7 Análise estatística

O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar as diferenças na freqüência de gênero e analisar se a prevalência de *Archaea* diferiu entre os grupos teste e controle no tempo inicial e 180 dias pós-terapia. A significância das diferenças dentro de indivíduos em cada grupo foi mensurada por meio do teste

McNemar qui-quadrado. A porcentagem de sítios com placa visível, sangramento gengival, BOP e supuração, bem como as médias de PS, NCI e colonização por *Archaea* foram calculados para cada indivíduo e, em seguida, a média entre os indivíduos nos dois grupos. A significância das diferenças entre os dois grupos para a idade e os parâmetros clínicos foi determinada por meio do teste U de Mann-Whitney. O teste de Wilcoxon foi usado para detectar diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo entre os dois tempos experimentais. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

Não houve desistências durante o decurso do período experimental. Todos os sujeitos retornaram para a avaliação de 180 dias pós-terapia. Assim, um total de 30 indivíduos completaram o estudo, 15 no grupo controle e 15 no grupo teste.

5.1 Resultados clínicos

A Tabela 2 apresenta as características demográficas e as médias dos parâmetros clínicos para os dois grupos experimentais, no início do estudo e 180 dias pós-terapia. Ambos os grupos demsonstraram homogeneidade para idade e distribuição do gênero. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para qualquer parâmetro clínico no início do estudo ($p > 0,05$). Todas as terapias levaram a uma diminuição estatisticamente significativa na média de profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, e no percentual de sítios com placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração. Aos 180 dias pós-terapia, a média de boca-toda para o parâmetro profundidade de sondagem foi significativamente menor no grupo teste em comparação ao grupo ($p<0,05$).

As alterações médias ocorridas entre o início do estudo e 180 dias pós-terapia para as variáveis profundidade de sondagem e nível clínico de inserção estão apresentados na Tabela 3. A análise dos dados demonstrou que as reduções foram mais acentuadas no grupo que recebeu antibioticoterapia, tanto para profundidade de sondagem como para nível clínico de inserção ($p<0,05$).

5.2 Resultados microbiológicos

Um total de 540 amostras de biofilme subgengivais foram analisadas (135 a partir de cada grupo experimental em cada tempo). A prevalência de indivíduos do grupo teste positivos para *Archaea* no início do estudo e 180 dias pós-terapia, em ambos os grupos, são apresentados na Tabela 4. Dezoito indivíduos estavam colonizados por *Archaea* no início do estudo, sendo nove no grupo controle e nove no grupo teste ($p>0,05$). Ambos os grupos de tratamento reduziram

significativamente a prevalência de indivíduos colonizados por esta espécie em 180 dias pós-terapia ($p<0,05$). Não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamento para a prevalência de indivíduos colonizados por *Archaea* no final do estudo ($p>0,05$).

As percentagens médias de sítios colonizados por *Archaea* no início do estudo e 180 dias pós-terapia estão apresentados na Tabela 5. Não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamento nos tempos experimentais ($p>0,05$). Ambas as terapias levaram a uma diminuição estatisticamente significativa na média percentual de sítios colonizados por *Archaea* ($p<0,05$).

Tabela 2. Características demográficas e média (±DP) de boca-toda para os parâmetros clínicos no início do estudo e 180 dias pós-terapia, nos dois grupos terapêuticos.

Variável	Tempo	Grupos Terapêuticos	
		Controle (n=15) RAR	Teste (n=15) RAR+MTZ+AMX
Gênero (masc/fem)	Início	4/11	6/9
Idade (anos)	Início	27,6±3,5	26,8±3,9
PS (mm)	Início	4,1±0,6[a]	4,3±0,7 [a]
	180 dias*	3,2±0,6[b]	2,7±0,5 [b]
NCI (mm)	Início	4,2±0,5 [a]	4,5±0,8 [a]
	180 dias	3,5±0,5 [b]	3,2±0,5 [b]
% sítios com:			
Placa visível	Início	62,7±22,4 [a]	61,3±19,8 [a]
	180 dias	34,8±16,5 [b]	34,3±15,0 [b]
SG	Início	23,7±20,4 [a]	37,3±27,2 [a]
	180 dias	5,0±6,5 [b]	3,8±0,4 [b]
SS	Início	63,8±21,3 [a]	77,7±19,7 [a]
	180 dias	12,5±11,7 [b]	12,2±13,0 [b]
Supuração	Início	3,8±9,3 [a]	1,8±3,8 [a]
	180 dias	0,2±0,1 [b]	0±0 [b]

Teste de Wilcoxon: diferenças estatísticas entre os tempos experimentais em cada grupo (letras distintas indicam p<0,05).
Teste U de Mann-Whitney: diferenças estatísticas entre os grupos em cada tempo experimental (* p<0,05).
DP: desvio-padrão; RAR: raspagem e alisamento radicular; MTZ: metronidazol; AMX: amoxicilina; PS: profundidade de sondagem; NCI: nível clínico de inserção; SG: sangramento gengival; SS: sangramento à sondagem.

Tabela 3. Média (±DP) de redução de boca-toda entre o início do estudo e 180 dias pós-terapia, para os parâmetros profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NCI), nos dois grupos terapêuticos.

Variável	Grupos Terapêuticos		valor de *p* *
	Controle (n=15) RAR	Teste (n=15) RAR+MTZ+AMX	
PS (mm)	0,76 ± 0,48	1,08 ± 0,40	0,010
NCI (mm)	0,60 ± 0,45	0,76 ± 0,42	0,013

* Teste U de Mann-Whitney: diferenças estatísticas entre os grupos em cada tempo experimental.
DP: desvio-padrão; RAR: raspagem e alisamento radicular; MTZ: metronidazol; AMX: amoxicilina.

Tabela 4. Freqüência (%) de detecção de *Archaea* em indivíduos dos dois grupos terapêuticos, no início do estudo e 180 dias pós-terapia.

Tempo	Variável	Condição	Grupos Terapêuticos		valor de *p* *
			Controle # número (%)	Teste # número (%)	
Início	Detecção de *Archaea*	Negativa	6 (40%)	6 (40%)	NS
		Positiva	9 (60%)	9 (60%)	
180 dias	Detecção de *Archaea*	Negativa	11 (73,3%)	12 (70%)	NS
		Positiva	4 (27,7%)	3 (30%)	

As diferenças estatísticas das distribuições de frequências foram testadas por meio do teste Qui-quadrado (* p>0,05, NS = não significante, diferenças em cada tempo; # p<0,05, diferenças em cada grupo).

Tabela 5. Média da prevalência (%) de sítios colonizados por *Archaea* nos dois grupos terapêuticos, no início do estudo e 180 dias pós-terapia.

Tempo	Grupos Terapêuticos		valor de *p* *
	Controle (n=15) RAR	Teste (n=15) RAR+MTZ+AMX	
Início	59,2 ± 18,4[a]	53,3 ± 22,5[a]	NS
180 dias	22,6 ± 12,4[b]	19,3 ± 10,5[b]	NS

Teste de Wilcoxon: diferenças estatísticas entre os tempos experimentais em cada grupo (letras distintas indicam p<0,05).
* Teste U de Mann-Whitney: diferenças estatísticas entre os grupos em cada tempo experimental (p>0,05, NS = não significante).

6 DISCUSSÃO

Estudos anteriores indicaram que o domínio *Archaea* é frequentemente detectado em sítios com grande destruição periodontal, sugerindo sua relação com a patogenia da periodontite (Belay *et al.*, 1988; Kulik *et al.* 2001; Lepp *et al.*, 2004; Yamabe *et al.*, 2008; Vianna *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). Entretanto, microrganismos do domínio *Archaea* não foram ainda reconhecidos como verdadeiros patógenos de doença humana (Cavichiolli *et al.*, 2003; Eckburg *et al.*, 2003, Macario, 2008). Desta forma, este estudo teve como objetivo contribuir com o conhecimento sobre o papel de microrganismos do domínio *Archaea* no ecossistema subgengival, visando estabelecer se a sua detecção seria influenciada após a aplicação de duas diferentes modalidades de terapia periodontal.

Em relação aos resultados no exame inicial, a freqüência de detecção de *Archaea* em indivíduos com periodontite agressiva generalizada foi de 60% (Tabela 4). A alta frequência de *Archaea* coincide com os valores apresentados em estudos prévios que utilizaram o mesmo par de iniciadores para o gene *16S rRNA* de *Archaea*, nos quais *Archaea* foi detectado em 77% dos indivíduos, com diferentes tipos de doença periodontal, incluindo periodontite crônica e agressiva (Kullik *et al.* 2001, Matarazzo *et al.* 2011, Faveri *et al.* 2011) e em 73,5% dos indivíduos com periodontite crônica (Li *et al.*, 2009). No entanto, a frequência de detecção de *Archaea* por indivíduo apresentada aqui é consideravelmente maior do que em estudos que empregaram outro par de iniciadores domínio-específico, cujas frequências de indivíduos positivos variaram de 22,4 a 36%, por PCR convencional e quantitativo, respectivamente (Lepp *et al.* 2004; Yamabe *et al.* 2008). Utilizando iniciadores para o gene *mcrA,* Vianna *et al.* (2008) relataram uma prevalência de 43,1% em indivíduos com sinais clínicos de destruição periodontal; frequência intermediária aos estudos que optaram por usar como alvo a subunidade menor do RNA ribossômico.

Quando a análise da presença de *Archaea* foi realizada por sítio, o gene *16S rRNA* de *Archaea* foi detectado por PCR convencional em aproximadamente 50% dos sítios dos indivíduos com periodontite agressiva generalizada (Tabela 5). Os dados de detecção por PCR convencional se assemelham aos dados encontrados na literatura propostos por Matarazzo *et al.* (2011) que detectaram

Archaea em 60% dos sítios dos indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Por outro lado, Yamabe *et al.* (2008) detectaram *Archaea* em apenas em 17,4% dos sítios de 17 indivíduos com periodontite agressiva.

Aspectos metodológicos, como número de amostras analisadas por indivíduo, podem dificultar a comparação dos resultados entre os estudos. No presente estudo *Archaea* foi detectada em amostras subgengivais de mais da metade dos indivíduos dos grupos, em concordância aos resultados por sítio. Outro ponto a ser considerado são as possíveis diferenças na prevalência de *Archaea* entre as diferentes populações. Diferenças no perfil de colonização de microrganismos periodontopatogênicos foram relatadas em amostras de biofilme subgengival de indivíduos com periodontite crônica de diferentes regiões geográficas (Haffajee *et al.*, 2004; Haffajee *et al.*, 2005). Da mesma maneira, as evidências apontam diferenças na prevalência de microrganismos metanogênicos entre populações. A análise do nível de metano no hálito permitiu mostrar que a proporção de metanogênicos entre a população adulta nos Estados Unidos e na Grã-Bretanha foi maior do que no Japão (Morii *et al.*, 2003).

Independentemente da modalidade terapêutica, observou-se uma redução significante na prevalência de indivíduos (Tabelas 4 e 5) e na prevalência de sítios positivos para a presença de *Archaea* aos 180 dias pós-terapia. Ao início do estudo, 9/15 indivíduos de ambos os grupos Controle e Teste eram positivos para a presença de *Archaea*. Aos 180 dias pós-terapia, ambas as terapias apresentaram uma redução no número de indivíduos positivos para este microrganismo, sem diferenças estatísticas entre eles. Os resultados obtidos são de difícil comparação, uma vez que este é o primeiro estudo que analisou o perfil de colonização deste microrganismo antes e após a terapia periodontal.

Em relação às terapias propostas, o tratamento das infecções periodontais com associação de antibióticos sistêmicos permite efeitos microbiológicos mais favoráveis e, consequentemente, benefícios clínicos, devido à capacidade dos antimicrobianos sistêmicos em alcançar os patógenos periodontais localizados em sítios profundos através de sua presença no fluido crevicular. A presença do antibiótico na saliva promove redução ou supressão dos patógenos em outras áreas da cavidade oral, como língua e mucosas, diminuindo a possibilidade

de re-infecção dos sítios periodontais tratados (Slots *et al.*, 2004). Neste contexto, em relação aos resultados clínicos, pode-se dizer que apesar das duas terapias ter levado a uma redução significativa nas médias de boca-toda em todos os parâmetros clínicos aos 180 dias pós-terapia (Tabela 2), o grupo que associou RAR+antibióticos apresentou as maiores reduções médias em PS e NCI em relação ao grupo controle (Winkel *et al.*, 1997; Soder *et al.*, 1990; López *et al.*, 2000; Feres *et al.*, 2001; Winkel *et al.*, 2001; Rooney *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004; Dannewitz *et al.*, 2007; Haffajee *et al.*, 2007; Moeintaghavi *et al.*, 2007; Matarazzo *et al.*, 2008; Cionca *et al.*, 2009; Mestnik *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011).

Apesar das evidências existentes na literatura sobre a participação de *Archaea* na microbiota em humanos, ainda não são conhecidos exemplos de patógenos do terceiro domínio de vida. Pelos resultados apresentados, ainda não está bem clara a contribuição de *Archaea* na patogênese da doença periodontal em humanos. Existe um consenso de que este domínio possui uma relação indireta com as doenças infecciosas, favorecendo o crescimento de outros microrganismos, os quais, por sua vez, estão diretamente envolvidos na patogênese (Lepp *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2006; Higuchi *et al.*, 2009). Desta forma, é interessante estabelecer não somente a presença ou ausência desses microrganismos após a terapia periodontal, mas também os diferentes níveis de metanogênicos e sua relação com espécies periodontopatogênicas com o objetivo de sedimentar de forma mais sustentável o envolvimento ou não destas espécies com as doenças periodontais.

7 CONCLUSÃO

Apesar da associação do metronidazol+amoxicilina à RAR evidenciar os melhores benefícios clínicos, as duas terapias testadas reduziram igualmente a prevalência de *Archaea*, sendo que não foram observadas diferenças importantes entre os grupos em 180 dias pós-terapia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int Dent J. 1975; 25(4): 229-235.

Araujo MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. J Periodontol. 2003;74(12):1763-1740.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Annals Periodontology 1999;4:1- 6.

American Academy of Periodontology. The role of supra- and subgingival irrigation in the treatment of periodontal diseases [position paper]. J Periodontol. 2005 May; 76:2015-2027.

Belay N, Mukhopadhyay B, Conway de Macario E, Galask R, Daniels L. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. J Clin Microbiol. 1990 Jul;28(7):1666-1668.

Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. J Periodontol. 2007;78(4):696-704.

Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Goncalves C, Haffajee AD, Socransky SS *et al.* Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II - microbiological results. J Clin Periodontol. 2005;32:406-411.

Carvallho LH, D´Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population: I. Clinical results. J Clin Periodontol. 2004; 31:1017-1076.

Cavicchioli R, Curmi PM, Saunders N, Thomas T. Pathogenic *Archaea*: do they exist? Bioessays. 2003;25:1119-1128.

Chain E. Chemical properties and structure of the penicilins. Endeavour. 1948;7(supply27):83.

Chambrone L, Chambrone D, Lima LA, Chambrone LA. Predictors of tooth loss during long-term periodontal maintenance: a systematic review of observational studies. J Clin Periodontol. 2010;37(7):675-684.

Christersson LA, Slots J, Zambon JJ, Genco RJ. Transmission and colonization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. J

Periodontol. 1985;56:127-131.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalem WJ, Mendes MC, Uzeda M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. J Periodontol 2002; 73: 360-369.

Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon J.J. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2005; 32: 860-866.

Cosyn J, Sabzevar MM. Subgingival chlorhexidine varnish administration as an adjunct to same-day full-mouth root planing II. Microbiological observations. J Periodontol. 2007 Mar;78(3):438-45.

D'Avila GB, Carvalho LH, Feres-Filho EJ, Feres M, Leão A. Oral Health impacts on daily living related to four different treatment protocols for chronic periodontitis. J Periodontol. 2005; 76: 1751-1757.

Dewhirst FE, Tamer MA, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Boches SK, Galvin JI, Paster BJ. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. Oral. Microbiol. Immunol. 2000;15(3):196-200.

Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA. Archaea and their potential role in human disease. Infect Immun. 2003 Feb;71(2):591-596.

Faveri M, Gursky LC, Feres M, Shibli JA, Salvador SL, de Figueiredo LC. Scaling and root planing and chlorhexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, placebo-controlled clinical trial. J Clin Periodontol 2006; 33: 819–828.

Faveri M, Feres M, Shibli JA, Hayacibara RF, Hayacibara MM, de Figueiredo LC. Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans. J Periodontol. 2006 Sep;77:1539-1546.

Faveri M, Mayer MP, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. Oral Microbiol Immunol. 2008 Apr;23(2):112-118.

Faveri M, Gonçalves LF, Feres M, Figueiredo LC, Gouveia LA, Shibli JA, Mayer MP. Prevalence and microbiological diversity of Archaea in peri-implantitis subjects by 16S ribosomal RNA clonal analysis. J Periodontal Res. 2011 Jun;46(3):338-344

Feres-Filho EJ, Silva CM, Giovannetti-Menezes N, Torres MC, Leão ATT, Sansone C. Treatment of chronic periodontitis with systemic antibiotics only. J Clin Periodontol 2006; 33: 936–937.

Fermiano D, Lira EAG de, Sampaio FR, Figueiredo LC de, Feres M, Faveri M. Prevalência de archaea em indivíduos com doença periodontal e saúde periodontal. Braz J Periodontol. 2011;21(4):86-93.

Florey ME, McFarlan AM, Mann I. Report of forty-eight cases of marginal blepharitis treated with penicillin. Br J Ophthalmol. 1945; 29 (supply 9):333-338.

Fritschi BZ, Albert-Kiszely A, Persson GR. Staphylococcus aureus and other bacteria in untreated periodontitis. J Dent Res. 2008;87(6):589-593.

Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras *et al.* Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. J Periodontol. 2005; 76: 289-294

Goodson JM, Feres M. Antibiotics and control of plaque-related diseases. In: Dental Plaque Revisited Oral, Oral Biofilms in health and Disease, 1999, Londres.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky, SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. J Clin Periodontol 1997; 24:324-334.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994; 5: 78-111.

Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. Oral Microbiology Immunology. 2006;21:269-282.

Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. Oral Microbiology Immunology. 2008;23:196-205.

Han N, Xiao X, Zhang L *et al.* Bacteriological study of juvenile periodontitis in China. J Periodont Res 1991; 26: 409-414.

Horz HP, Conrads G. Methanogenic Archaea and oral infections - ways to unravel the black box. J Oral Microbiol. 2011 Feb 23;3

Ishikawa I, Kawashima Y, Oda S, Iwata T, Arakawa S. Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. J Periodontal Res. 2002; 37: 324-332.

Jenkins WMM, MacFarlane TW, Gilmour WH, Ramsay I; MacKenzie D. Systemic metronidazole in the treatment of periodontitis. J Clin Periodontol. 1989; 16:443-450.

Jowett AK, Orr MTS, Rawlinson A, Robinson PG. Psychosocial impact of periodontal disease and its treatment with 24-h root surface dedridement. J Clin Periodontol. 2009; 36: 413-418.

Kamma JJ, Contreras A, Slots J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. J Clin Periodontolol 2001; 28: 879-885.

Kamma JJ, Nakou M, Persson RG. Association of early onset periodontitis microbiota with aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid. J Clin Periodontol 2001; 28: 1096-1105.

Kamma JJ, Nakou M, Gmur R, Baehni P.C. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. Oral Microbiology and Oral Immunology 2004; 19: 314-321.

Kaner D, Bernimoulin JP, Hopfenmüller W, Kleber BM, Friedmann A. Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. J Clin Periodontol; 2007a; 34(10):880-891.

Kaner D, Christan C, Dietrich T, Bernimoulin JP, Kleber BM, Friedmann A. Timing affects the clinical outcome of adjunctive systemic antibiotic therapy for generalized aggressive periodontitis. J Periodontol. 2007b; (7):1201-1208.

Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. Periodontology 2000. 2001; 25: 8-20.

Koshy G, Corbet EF, Ishikawa I. A full-mouth disinfection approach to nonsurgical periodontal therapy – prevention of reinfection from bacterial reservoirs. Periodontology 2000. 2004; 36: 166-178.

Kulik EM, Sandmeier H, Hinni K, Meyer J. Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis. Fems Microbiol Lett**.** 2001;196:129-133.

Lang NK. Consensus reports: aggressive periodontitis Ann Periodontol. 1999;4 (1):53.

Lee JW, Choi BK, Yoo YJ, Choi SH, Cho KS, Chai JK, et al. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. J Periodontol 2003; 74: 1329-1335.

Lepp PW, Bring MM, Ouverney CC, Palm C, Armitage GC, Relman DA.. Methanogenic *Archaea* and human periodontal disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;16:6176-6181.

Listgarten MA, Lindhe J, Helldén L. Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. J Clin Periodontol 1978; 5: 246-271.

Löe H, Theilade E, Jensen B. Experimental gingivitis in man. J Periodontol 1965; 36: 177-187.

Loesche W. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev 1976; 9: 65-107.

Loesche W, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J Periodontol 1985; 56(8): 447-456.

Lopez NJ, Mellado JC, Leighton GX. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. J Clin Periodontol 1996; 23: 101-105

López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2006; 33:648-660.

Maiden MFJ, Tanner A, McArdle S, Najpauer K, Goodson JM. Tetracycline fiber therapy monitored by DNA probe and cultural methods. J Periodont Res. 1991;26:452-459.

Mandell RI, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomintas* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. J Periodontol 1981; 52: 593.

Mandell RL, Ebersole JL, Socransky SS. Clinical, immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. J Clin Periodontol. 1987; 14:534-540.

Matarazzo F, Ribeiro AC, Feres M, Faveri M, Mayer MP. Diversity and quantitative analysis of Archaea in aggressive periodontitis and periodontally healthy subjects. J Clin Periodontol. 2011 Jul;38(7):621-627.

Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Löe H. Oral health of United States adults. The National Survey of Oral Health in U.S. em ployed adults and seniors: 1985-1986 national findings. NIH Publication no.87-2868. Bethesda, MD:NIDR, 1987.

Moeintaghavi A, Talebi-ardakani MR, Haerian-ardakani A, Zandi H, Taghipour S, Fallahzadeh H, Pakzad A, Fahami N. Adjunctive effects of systemic amoxicillin and metronidazole with scaling and root planing: a randomized, placebo controlled clinical trial. J Contemp Dent Pract. 2007; 8(5):51-59.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. J Clin Periodontol. 2002, 29 (Suppl 3):10-21.

Moore WEC, Moore LH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994; 42(3): 127-138.

Mullally, Dace B, Shelburne CE, Wolf LF, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early onset periodontitis. J Periodontol Res 2000; 35: 232-241.

Norskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus paraphrophilus and Haemophilus segnis as Aggregatibacter actinomycentencomitans gen nov comb nov Aggregatibacter aphrophilus comb nov and Aggregatibacter segnis comb nov* and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor independent isolates. International J Sys Evol of Microbiol 2006; 56: 2135-2146.

Paster BJ, S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst. . Bacterial diversity in human subgingival

plaque. J. Bacteriol 2001; 183: 3770-3783.

Robichaux M, Howell M, Boopathy R. Growth and activities of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in human oral cavity. Curr Microbiol. 2003 Jul;47(1):12-16.

Russo PA, Nowzari H, Slots J. Transmission and persistence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in twins with advanced periodontitis. J Calif Dent Assoc 1998; 26: 290-294.

Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. J Periodontal Res. 2005 Jun;40(3):277-285.

Schenkein HA, Burmeister JA, Koertge TE *et al.* The influence of race and gender on periodontal flora. J Periodontol 1993; 54: 292-296.

Silva-Boghossian CM da, Souto RM do, Luiz RR, Colombo APV. Association of red complex, A. actinomycetemcomitans and non-oral bacteria with periodontal diseases. Ach Oral Biol. 2011;56:899-906.

Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. Infect Immun 1980; 29: 1013.

Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. J Dent Res 1970; 49: 203-222.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. Periodontol 2000 1994; 5: 7-25.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. “Checkerboard” DNA-DNA hybridization. Biotechniques 1994; 17 (4): 788-792.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25: 134-144.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hydridization to study complex microbial ecosystems. Oral Microbiol Immunol. 2004;19:352-362.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000 2005; 38: 135-187.

Takeuchi Y, Umeda M, Ishizura M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in agressive periodontitis patientes in a Japanese population. J Periodontol 2003; 74:1060-1069.

Tinoco EM, Lyngstadaas SP, Preus HR, Gjermo P. Attachment loss and serum antibody levels against autologous and reference strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in untreated localized juvenile periodontitis patients. J Clin Periodontol 1997; 24: 937-944.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. Annals of Periodontology 1999; 4:39-53

Trevilatto PC, Tramontina VA, Machado MA, Goncalves RB, Sallum AW, Line SR. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis. J Clin Periodontol 2002, 29:233-239.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. Nature. 2007 Oct 18;449(7164):804-810.

van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. J Clin Periodontol 2005; 32:893- 898.

Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006 Apr;44(4):1274-1282.

Vianna ME, Holtgraewe S, Seyfarth I, Conrads G, Horz HP. Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. J Bacteriol. 2008 May;190(10):3779-3785.

Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. J Med Microbiol. 2007 Jan;56(Pt 1):110-118.

Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Solo V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas J-Y, Alcantara-Maruri E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2006; 33: 869-877.

Yamabe K, Maeda H, Kokeguchi S, Tanimoto I, Sonoi N, Asakawa S, Takashiba S. Distribution of Archaea in Japanese patients with periodontitis and humoral immune response to the components. FEMS Microbiol Lett, 2008 Oct; 287(1): 69-75.

Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. Eur J Oral Sci. 2005; 113:28-33.

Zambon JJ, Chistersson LA, Slots J. Prevalence in patient groups and distribuition of biotypes and serotypes within families. J Periodontol 1983; 54: 707-711.

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol 1985; 12: 1-20.

Walker CB, Pappas JD, Tyler KZ, Cohen S, Gordon JM. Antibiotic susceptibilities of periodontal bacteria. In vitro susceptibilities to eight antimicrobial agents. J Periodontol. 1985; 56(11 Suppl):67-74.