



**CEPPE**  
Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

**Doutorado em Odontologia**  
**Área de concentração em Periodontia**

**EDUARDO SOUZA DE LOBÃO VERAS**

Avaliação de possíveis “novos” patógenos  
periodontais: estudos de Associação e Eliminação

Guarulhos  
2013

**EDUARDO SOUZA DE LOBÃO VERAS**

**Avaliação de possíveis “novos” patógenos  
periodontais: estudos de Associação e Eliminação**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Magda G. Feres**  
**Co-orientadora: Profa. Dra. Luciene C. Figueiredo**

Guarulhos  
2013

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Fernando Gay da Fonseca**

V476a

Veras, Eduardo Souza de Lobão

Avaliação de possíveis “novos” patógenos periodontais: estudos de Associação e Eliminação / Eduardo Souza de Lobão Veras. -- 2013.

78 f.; 31 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magda G. Feres

Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2013.

1. Periodontite. 2. *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. 3. Etiologia. 4. Tratamento Periodontal. 5. Novos Periodontopatógenos. I. Avaliação de possíveis “novos” patógenos periodontais: estudos de Associação e Eliminação. II. Universidade Guarulhos.

CDD. 617

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS "NOVOS" PATÓGENOS PERIODONTAIS: ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO E ELIMINAÇÃO" em sessão pública realizada em 17 de Dezembro de 2013 considerou o candidato Eduardo Souza de Lobão Veras aprovado.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Profa. Dra. Magda Feres (UnG)



2. Prof. Dr. Sergio Luiz de Souza Salvador (FCFRP-USP)



3. Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer (ICB-USP)



4. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (UnG)



5. Profa. Dra. Paula Juliana Pérez Chaparro (UnG)



Guarulhos, 17 de Dezembro de 2013.

# DEDICATÓRIA

*Para minha esposa Andréa Parente Lobão Veras.*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, Ruy Alves de Lobão Veras (in memoriam) e Joana Maria Souza de Lobão Veras, ambos Cirurgiões-Dentistas e Professores, por terem despertado em mim a paixão pelas duas carreiras.*

*À minha orientadora, prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Magda Feres, por sua capacidade de encantar e contagiar a todos com sua competência e capacidade de trabalho intelectual. Você é hoje minha maior referência no meio científico.*

*À minha co-orientadora, prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciene Figueiredo, um dos meus melhores exemplos de dedicação e amor à vida acadêmica.*

*Ao prof. Dr. Marcelo de Faveri, por suas valiosas dicas, críticas e sugestões, essenciais para a construção deste trabalho.*

*À profa. Dr.<sup>a</sup> Juliana Perez-Chaparro Mc Culloch e Cristiane Gonçalves, pelas inestimáveis contribuições que foram fundamentais para a construção deste trabalho, especialmente na elaboração do artigo de Revisão Sistemática.*

*Aos componentes da banca, em especial aos professores de outras IESs: prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador e prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Pinto Alves Mayer, pela disponibilidade e prontidão que demonstraram em empregar suas vigorosas capacidades científicas para o engrandecimento dessa obra.*

*À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Teles, pela preciosa ajuda, especialmente na fase inicial deste trabalho na sugestão e fornecimento de cepas bacterianas incluídas nessa pesquisa.*

*À Izilvânia, bióloga responsável pelo laboratório de pesquisas microbiológicas da UNG, pelas muitas horas de convivência e aprendizado. Parte considerável dessa obra é fruto da sua dedicação.*

*À Dr.<sup>a</sup> Geisla Mary Soares, por toda a sua contribuição para a realização do estudo de eliminação dessa tese.*

*À prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Souza de Lobão Veras Barros, pelas dicas e incentivo na elaboração deste trabalho.*

*À prof.<sup>a</sup> Ms. Marta Rosado de Oliveira Campos, estimada companheira de disciplina no Centro Universitário Uninovafapi (UNINOVAFAPI), cujo suporte e amizade foram determinantes para a realização deste curso.*

*À Universidade Guarulhos (UNG), pela oportunidade de qualificação e crescimento profissional que me foi propiciada.*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UNG, pelo profissionalismo e cordialidade com que me receberam e dividiram comigo seus conhecimentos e experiências profissionais.*

*À UNINOVAFAPI, pelo incentivo e apoio ao meu crescimento profissional e de todos os demais professores da instituição.*

*Aos professores do Curso de Odontologia da UNINOVAFAPI pela prontidão e disponibilidade em me substituir nos momentos de ausência das minhas atividades acadêmicas, para a realização deste curso.*

*Aos meus colegas de turma, com quem tive o privilégio de conviver e aprender muito, durante todo o período do curso de Doutorado.*

*Muito Obrigado a todos!*

*"Estranha é nossa situação aqui na Terra. Cada um de nós vem para uma curta passagem, sem saber por quê, ainda que algumas vezes tentando adivinhar um propósito. Do ponto de vista da vida cotidiana, porém, de uma coisa sabemos: o homem está aqui pelo bem de outros homens – acima de tudo daqueles de cujos sorrisos e bem-estar nossa própria felicidade depende."*

*Albert Einstein*



## RESUMO

Justificativa: Algumas bactérias orais são responsáveis pelo início e progressão das doenças periodontais. O conhecimento atual sobre a etiologia microbiana das periodontites foi ampliado a partir dos estudos de Socransky et al. (1988) que descreveram os "complexos microbianos" presentes na placa subgingival utilizando sondas de DNA para 40 espécies bacterianas. No entanto, atualmente é reconhecido que mais de 400 outras espécies bacterianas podem colonizar o ambiente subgingival, muitas das quais têm sido sugeridas como potenciais patógenos periodontais. Porém, ainda há escassez de dados na literatura sobre o papel de muitas dessas "novas" espécies na etiologia das periodontites.

Objetivo: Sendo assim, o presente estudo teve como objetivos: i) Avaliar a possível relação de 39 "novas" espécies bacterianas com a etiologia da periodontite crônica e ii) Determinar o comportamento dessas espécies após raspagem e alisamento radicular (RAR) isoladamente ou em combinação com metronidazol (MTZ) e amoxicilina (AMX) sistêmicos.

Metodologia: 40 voluntários com periodontite crônica e 17 voluntários com saúde periodontal foram selecionados. Os dois grupos foram comparados quanto a presença e os níveis de 39 "novas" espécies bacterianas. (i). Na segunda etapa do estudo, os 40 voluntários com periodontite crônica foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos terapêuticos: controle (n=20): RAR; e Teste (n=20): RAR + MTZ (400mg) + AMX (500mg), ambos 3 vezes/dia por 14 dias. Foram determinados os efeitos das duas terapias sobre as 39 "novas" espécies bacterianas avaliadas na primeira fase do estudo, e sobre as 40 espécies dos complexos bacterianos sugeridos por Socransky et al. (1988) (ii). Para as análises microbiológicas foram coletadas nove amostras de biofilme subgingival de todos os voluntários no início do estudo e dos voluntários com periodontite crônica em 3 meses e 1 ano, e foram avaliadas pela técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Resultados: Oito das 39 "novas" espécies bacterianas avaliadas foram consideradas como tendo forte associação com periodontite, pois estavam em um maior percentual de indivíduos e de sítios, e em níveis mais elevados no grupo de periodontite crônica do que no periodontalmente saudável, tanto na avaliação de boca toda, quanto para os sítios rasos ( $p < 0.05$ ). Outras quatro espécies foram categorizadas como de associação Moderada, por estarem elevadas no grupo de periodontite em quatro desses cinco parâmetros avaliados ( $p < 0.05$ ). Essas 12 espécies que mostraram associação Forte ou Moderada com periodontite foram significativamente reduzidas pela terapia de RAR+MTZ+AMX, porém apenas quatro delas - *Enterobacter gergoviae*, *Haemophilus influenza*, *Staphylococcus warneri* e *Spiroplasma ixodetis* - foram significativamente reduzidas pela RAR. Conclusões: As espécies *A. rimae*, *C. sakazakii*, *E. gergoviae*, *E. faecalis*, *E. limosum*, *F. alocis*, *H. influenzae*, e *S. warneri* foram fortemente associadas à ocorrência de periodontite crônica generalizada, enquanto que as espécies *E. coli*, *F. necrophorum*, *S. ixodetis* e *S. aureus* apresentaram associação moderada com a ocorrência dessa doença.

**Palavras-chave:** periodontite, *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, etiologia, tratamento periodontal, novos periodontopatógenos.

## ABSTRACT

**Rationale:** Some oral bacteria are responsible for the onset and progression of periodontal diseases. Current knowledge on the microbial etiology of periodontitis was expanded from the studies of Socransky et al. (1988), who described the microbial complexes present in the subgingival plaque using DNA probes for 40 bacterial species. However, it is now recognized that more than 400 other bacterial species may colonize the subgingival environment, many of which have been suggested as potential periodontal pathogens. However, there are insufficient data in the literature on the role of several of these “novel” pathogens in the etiology of periodontitis. **Objective:** Therefore, this study aimed to: (i) assess the possible association of 39 “new” bacterial species with the etiology of chronic periodontitis and ii) determine the behavior of these species after scaling and root planing (SRP) alone or in combination with systemic metronidazole (MTZ) and amoxicillin (AMX). **Methods:** 40 volunteers with chronic periodontitis and 17 with periodontal health were selected. The two groups were compared for the presence and levels of 39 “new” bacterial species (i). In the second phase of the study, the 40 volunteers with chronic periodontitis were randomly assigned to two treatment groups: control (n=20): RAR, and test (n=20): RAR+MTZ (400 mg) + AMX (500 mg), both TID for 14 days. The effect of these two therapies on the presence and levels of the 39 “new” species assessed in the first phase of the study, and on 40 species of the microbial complexes suggested by Socransky et al. (1988) were evaluated (ii). For the microbiological analysis, nine subgingival biofilm samples were collected from all the volunteers at baseline and from the volunteers with chronic periodontitis at 3 months and 1 year. The samples were analyzed by Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Results:** Eight of the 39 “new” bacterial species evaluated were considered to have Strong association with periodontitis. They colonized a higher percentage of individuals and of sites, and were found at higher levels in the group of chronic periodontitis than in the periodontally healthy group; both for the full-mouth and for the shallow sites examinations ( $p < 0.05$ ). Four other species were categorized as having Moderate association with periodontitis. They were significantly elevated in the periodontitis group in four of the five parameters evaluated ( $p < 0.05$ ). These 12 bacterial species Strongly or Moderately associated with periodontitis were reduced by RAR+MTZ+AMX, while only four of them - *E. gergoviae*, *H. influenzae*, *S. warneri* and *S. ixodetis* - were statistically significantly reduced by RAR. **Conclusions:** The species *A. rima*, *C. sakazakii*, *E. gergoviae*, *E. faecalis*, *E. limosum*, *F. alocis*, *H. influenzae*, and *S. warneri* was strongly associated with the occurrence of chronic generalized periodontitis, while the species *E. coli*, *F. necrophorum*, *S. aureus* and *S. ixodetis* showed moderate association with the occurrence of this disease.

**Key-words:** periodontitis, checkerboard DNA-DNA hybridization, etiology, periodontal treatment, periodontal pathogens.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação gráfica do Minislot 30 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*) 32
- Figura 2** Representação gráfica do *Miniblotter* 45 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*) 33
- Figura 3** Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*) 34
- Figura 4** Média do percentual de sítios periodontais colonizados (prevalência) pelas espécies bacterianas avaliadas nos grupos de saúde e periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a média percentual de sítios colonizados no grupo com periodontite. 43
- Figura 5** Média da contagem ( $\times 10^5$ ) das espécies bacterianas avaliadas nos grupos de saúde e periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a média percentual de sítios colonizados no grupo com periodontite. 44
- Figura 6** Média do percentual de sítios periodontais rasos ( $PS \leq 3\text{mm}$ ) colonizados (prevalência) pelas espécie bacteriana avaliada nos grupos de saúde e periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a média percentual de sítios colonizados no grupo com periodontite. 45
- Figura 7** Média da contagem ( $\times 10^5$ ) em sítios rasos ( $PS \leq 3\text{mm}$ ) das espécies bacterianas avaliadas nos grupos de saúde e periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a média percentual de sítios colonizados no grupo com periodontite. 46
- Figura 8** Média da proporção das 80 espécies bacterianas avaliadas no grupo de periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a média percentual de sítios colonizados. 47

<b>Figura 9</b>	Média do percentual de sítios periodontais colonizados (prevalência) pelas “novas” espécies bacterianas avaliadas nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo, 3 meses e 1 ano pós-terapias, e comparação entre os grupos para alterações ocorridas entre o início do estudo e 1 ano pós-terapias.	52
<b>Figura 10</b>	Média da contagem ( $\times 10^5$ ) das “novas” espécies bacterianas avaliadas nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo, 3 meses e 1 ano pós-terapias, e comparação entre os grupos para alterações ocorridas entre o início do estudo e 1 ano pós-terapias.	53
<b>Figura 11</b>	Média do percentual de sítios periodontais colonizados (prevalência) pelas espécies bacterianas do painel tradicional do <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i> nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo, 3 meses e 1 ano pós-terapias, e comparação entre os grupos para alterações ocorridas entre o início do estudo e 1 ano pós-terapias.	54
<b>Figura 12</b>	Média da contagem ( $\times 10^5$ ) das espécies bacterianas do painel tradicional do <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i> nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo, 3 meses e 1 ano pós-terapias, e comparação entre os grupos para alterações ocorridas entre o início do estudo e 1 ano pós-terapias.	55
<b>Figura 13</b>	Média de proporção dos complexos bacterianos descritos por Socransky et al. (1998) nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo e 1 ano pós-terapias.	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Relação das espécies bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (Socransky et al., 1998; Socransky & Haffajee, 2002).	28
<b>Tabela 2</b>	Relação das “novas” espécies bacterianas utilizadas para a confecção das sondas de DNA.	29
<b>Tabela 3</b>	Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival.	33
<b>Tabela 4</b>	Parâmetros demográficos e clínicos nos grupos de periodontite crônica e saúde periodontal.	38
<b>Tabela 5</b>	Percentual de participantes colonizados pelas espécies bacterianas avaliadas nos grupos de saúde periodontal e periodontite crônica.	39
<b>Tabela 6</b>	Parâmetros demográficos e clínicos nos dois grupos terapêuticos no início do estudo; e em 1 ano pós-terapias para a variável primária de avaliação (sítios com PS $\geq$ 5mm) e para risco de futura progressão de doença.	49
<b>Tabela 7</b>	Síntese dos principais resultados dos Estudos de Associação e Eliminação.	57
<b>Tabela 8</b>	Categorização de “novas” espécies bacterianas incluídas na pesquisa de acordo com o grau de associação com periodontite crônica.	59

# SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	<b>Etiologia microbiana das infecções periodontais</b> .....	14
1.2	<b>Critérios para associação de agentes etiológicos à etiopatogenia das periodontites</b> .....	16
2.	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	19
3.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
3.1	<b>Seleção dos voluntários</b> .....	20
3.2	<b>Critérios de inclusão e exclusão</b> .....	21
3.3	<b>Delineamento experimental</b> .....	22
3.4	<b>Procedimentos terapêuticos</b> .....	22
3.4.1	Terapia periodontal básica (fase higiênica) .....	22
3.4.2	RAR .....	23
3.4.3	Administração de MTZ e AMX sistêmicos e placebos .....	23
3.5	<b>Avaliação clínico-periodontal</b> .....	24
3.6	<b>Avaliação microbiológica</b> .....	25
3.6.1	Seleção dos sítios-testes .....	25
3.6.2	Coleta das amostras do biofilme subgengival .....	25
3.6.3	Seleção das espécies bacterianas avaliadas e confecção das sondas de DNA.....	26
3.6.4	<i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i> (primeira hibridização)	30
3.6.5	Detecção das espécies .....	31

3.7	<b>Análise estatística</b> .....	35
3.7.1	Estudo de Associação .....	35
3.7.2	Estudo de Eliminação .....	35
3.8	<b>Parâmetros utilizados para a categorização dos possíveis “novos” patógenos periodontais</b> .....	37
4	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4.1	<b>Estudo de Associação</b> .....	38
4.2	<b>Estudo de Eliminação</b> .....	48
4.3	<b>Classificação dos possíveis “novos” patógenos periodontais</b> .....	57
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	60
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Etiologia microbiana das infecções periodontais

As doenças periodontais são processos patológicos infecto-inflamatórios que resultam na destruição dos tecidos de proteção e suporte dos dentes. O conceito atual da etiologia das doenças periodontais sugere que a sua ocorrência e progressão envolvem uma complexa interação entre as bactérias periodontopatogênicas presentes no biofilme subgengival e componentes do sistema imune do hospedeiro, além de fatores de risco ambientais, genéticos e sistêmicos (Page et al., 1997).

Assim como toda doença infecciosa, o tratamento eficaz das periodontites é dependente da identificação do(s) microrganismo(s) associados com o início e progressão dessas doenças. Isto nem sempre é um objetivo fácil de ser alcançado, especialmente nos casos de infecções mistas em áreas do corpo que são naturalmente contaminados, tais como o trato gastrointestinal e a cavidade oral. Sendo assim, dificuldades técnicas em se avaliar a complexa microbiota subgengival, altamente colonizada por vários microrganismos anaeróbios estritos e com grandes exigências nutricionais atrasou bastante o diagnóstico correto e conseqüentemente, o desenvolvimento de terapias periodontais mais efetivas. Novas técnicas de diagnóstico, não dependentes da viabilidade das bactérias para a sua identificação, tais como imunoensaios, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sondas de DNA (ácido desoxirribonucleico), foram introduzidos no final de 1980 e deram origem ao que se chamou da "busca moderna" dos agentes etiológicos de doenças periodontais destrutivas (Albandar et al., 1997; Bonta et al., 1985; Dzink et al., 1983; Lee et al., 1995; Socransky et al., 1991; Zappa et al., 1990). Utilizando essa técnica Socransky e colaboradores (1998) avaliaram a composição de 13.261 amostras de placa bacteriana subgengival de 160 voluntários com periodontite crônica e 25 com saúde periodontal, utilizando 40 sondas de DNA. Três complexos microbianos: amarelo, roxo e verde abrigavam várias espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro, incluindo *Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*, espécies de *Streptococcus spp* e *Capnocytophaga spp*. Mais tarde, um grupo de quatro espécies de *Actinomyces* também foi apontado como sendo relacionado à saúde



(Socransky & Haffajee, 2002). Estas espécies benéficas foram apontadas como colonizadores primários das superfícies dos dentes, cujo crescimento geralmente precede a multiplicação das espécies predominantemente gram-negativas dos complexos laranja e vermelho. O complexo laranja abrigava 12 espécies bacterianas, incluindo as espécies do gênero *Campylobacter* e *Fusobacterium*, *Eubacterium nodatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Streptococcus constellatus*. O complexo vermelho consistia de três patógenos intimamente relacionados: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, que foram detectados em maiores proporções em sítios doentes do que em sítios periodontalmente saudáveis e estavam fortemente associados com o aumento da profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem (SS). Esse estudo contribuiu sobremaneira para o entendimento da ecologia microbiana das periodontites e essas 40 espécies bacterianas têm sido utilizadas com sucesso como um marcador biológico em diversos estudos que avaliaram os efeitos de diferentes terapias periodontais (Mestnik et al., 2010; Feres et al., 2009; Matarazzo et al., 2008; Carvalho et al., 2005; Faveri et al., 2013; Sampaio et al. 2011; Socransky et al., 2013; Haffajee et al. 2008; Haas et al., 2012)

Posteriormente, já na década de 2000, com o objetivo de continuar a busca por novos patógenos periodontais ou microrganismos associados à saúde periodontal, algumas das técnicas moleculares existentes foram melhoradas e novas técnicas começaram a ser utilizadas para a avaliação da microbiota periodontal, destacando-se: 1) PCR em tempo real (Abiko et al., 2010); 2) amplificação do 16S rDNA, clonagem e sequenciamento (Paster et al., 2001); 3) sequenciamento direto de DNA metagenômico (trocar) (Griffen et al., 2012); 4) *human oral microbiome identification microarray* (HOMIM) (Colombo et al., 2009); 5) *RNA oligonucleotide quantification technique* (ROQT) (Teles et al., 2011).

Os dados da literatura sugerem que novas espécies bacterianas podem estar associadas ao início e progressão das periodontites. Também é importante ressaltar que a presença de bactérias na cavidade oral com potencial patogênico em outras regiões do corpo humano pode significar um eventual risco para a saúde geral do indivíduo. Vários estudos têm associado enfermidades periodontais com um aumento no risco ou na severidade de certas alterações sistêmicas, como lesões cardiovasculares (Desvarieux et al., 2005; Dogan et al.,

2005), pré-eclampsia (Contreras *et al.*, 2006; Barak *et al.*, 2007), partos prematuros (Hasegawa *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2007), nascimento de bebês de baixo peso (Dasanayake *et al.*, 2001) e diabetes (Sims *et al.*, 2002; Lalla *et al.*, 2006).

## 1.2. Critérios para associação de agentes etiológicos à etiopatogenia das periodontites

Durante quase 100 anos, os critérios utilizados para se associar um certo microrganismo à etiologia de uma infecção eram os postulados estabelecidos por Robert Koch em 1882:

*“1) The organism is regularly found in lesions of the disease; 2) The organism can be grown in pure culture on artificial media; 3) Inoculation of this culture produces a similar disease in experimental animals; and 4) The organism can be recovered from the lesions in these animals”.*

Porém, em 1979, Sigmund Socransky fez uma adaptação desses postulados para que eles pudessem ser aplicados de forma mais realista às doenças cárie e periodontal. Esses novos critérios ficaram conhecidos como os Postulados Modificados de Koch (Socransky 1979), e estão descritos na íntegra e no seu texto original a seguir:

*“1) Association with Disease: This criterion is a slight modification of Koch's first criterion. It implies an enrichment of the organism at sites of pathology and the corollary that the organism is in lower numbers or proportions or absent in healthy sites or sites with different forms of disease.*

*2) Elimination of the Organism: A critical test of the role of an organism in active disease is the determination of the effect of its elimination. If an organism is eliminated from, or suppressed in a lesion by mechanical debridement or chemotherapeutic agents, progress of the active lesion should stop. Organisms which remain in high numbers or proportions in the site are not sufficient by themselves for destruction to take place.*

*3) Host Response: The response of the host may provide an important guide into the role of certain organisms in dental disease. An increased or decreased cellular or humoral immune response to a given species in a specific form of clinical caries or periodontal*

*disease in the presence of a consistent response to other organisms might be suggestive of an organism with a special role in the disease process.*

*4) Animal Pathogenicity: Animal pathogenicity testing made up a significant part of Koch's postulates. A relatively finite spectrum of organisms has been shown to initiate caries or forms of periodontal disease in experimental animals. In each instance the organism tested was isolated in pure culture, initiated dental pathology in the animal and could be recovered in pure culture, fulfilling the last of Koch's postulates. As mentioned above, uncultivable organisms or organisms which failed to implant in the oral cavity of experimental animals cannot be tested. Further, the animal systems utilized to date utilize either monoinfected animals or animals in which the tested organism is present in overwhelming numbers. Most notable in animal pathogenicity testing has been the induction of severe caries in rodents by *Streptococcus mutans*. Other species of *Streptococci*, *Lactobacilli* and *Actinomyces* have also been shown to produce coronal or cemental caries in rodent systems. While *S. mutans* appears to produce animal caries more consistently and to a greater extent than the other species tested, it is not clear that this difference reflects a similar pathogenic potential in the human. The same arguments can be made for pathogenicity testing of potentially periodontopathic organisms. The destruction observed may or may not parallel that induced by the organism in the human. In spite of the reservations made, animal pathogenicity testing should remain part of the determination of the possible etiologic role of different species.*

#### *5) Mechanisms of Pathogenicity*

*Another criterion which could contribute to the determination of potential oral pathogens is the possession of unique characteristics which could contribute to the pathogenesis of the disease in question. Thus a potent mechanism of demineralization would be an essential prerequisite of organisms involved in the etiology of dental caries. Other mechanisms can be considered in destructive periodontal diseases as discussed below."*

A partir desses postulados, Socransky (1979) sugere que os tipos de estudos mais importantes para se associar um novo microorganismo a uma determinada patologia são os estudos de Associação (postulado 1) e os de Eliminação (postulado 2). A esse respeito o autor comenta:

*"Lack of association with the disease or failure to stop the progress of disease by suppressing the putative pathogen would be more troublesome than failure to detect an altered host immunologic response, initiate disease in an animal model system or detect unique determinants produced by the microorganism"*

Diversos estudos de Associação avaliaram a possível participação de "novos" patógenos na etiologia das periodontites, seja por técnicas de

diagnóstico microbiológico *targeted* ou *open-ended*. Porém, a maioria desses estudos avaliou poucas amostras de placa bacteriana e a grande maioria não observou o comportamento dessas espécies após tratamento periodontal por meio de estudos de Eliminação, ou seja, estudos intervencionais. Isso ocorre principalmente nos estudos que utilizaram técnicas de “extremidade aberta”, devido ao fato dessas análises ainda serem muito custosas. Logo, a realização de estudos de Associação e de Eliminação de maior porte pode auxiliar a determinar o real papel de possíveis “novas” espécies bacterianas na etiologia das periodontites. Esses resultados levariam a um melhor entendimento da ecologia da cavidade oral e poderiam ter benefícios clínicos diretos, no diagnóstico e tratamento das infecções periodontais.

## 2. PROPOSIÇÃO

Geral:

Contribuir para o conhecimento sobre a possível associação de “novas” espécies bacterianas com a etiologia da periodontite crônica.

Específicos:

Observar por meio de um Estudo de Associação a possível relação de “novas” espécies bacterianas com os estados de saúde periodontal e periodontite crônica.

Determinar por meio de um Estudo de Eliminação o comportamento dessas espécies bacterianas após medidas terapêuticas de raspagem e alisamento radicular isoladamente ou em combinação com antibióticos sistêmicos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Para testar o objetivo proposto nesse trabalho, foram desenhados dois estudos, um de Associação e outro de Eliminação.

No estudo de Associação foram avaliadas a prevalência e os níveis de 39 espécies bacterianas em voluntários com saúde e periodontite crônica; e o estudo de Eliminação avaliou o comportamento dessas espécies frente à terapia periodontal atualmente considerada a mais efetiva para o tratamento da periodontite crônica generalizada: raspagem e alisamento radicular (RAR) associada ao metronidazol (MTZ) e à amoxicilina (AMX) de administração sistêmicos (Feres et al. 2012, Soares et al. 2013, Goodson et al. 2012, Feres et al. 2013, Sgolastra et al. 2012, Zandbergen et al. 2013). No estudo de Eliminação, além das 39 espécies incluídas no estudo de Associação, foram avaliadas também as 40 espécies bacterianas do painel tradicional do artigo dos complexos microbianos sugeridos por Socransky (1998). Essas espécies foram utilizadas como marcadores biológicos. A RAR foi utilizada como terapia controle.

#### **3.1. Seleção dos voluntários**

A seleção de voluntários foi realizada por dois mestrados em Odontologia, área de concentração em periodontia, sob supervisão dos professores da disciplina, após a apreciação e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos (UnG). Quarenta voluntários portadores de periodontite crônica e 17 voluntários periodontalmente saudáveis foram selecionados na Clínica Odontológica da UnG a partir de uma triagem de 657 voluntários que procuraram atendimento nessa clínica. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e terapias a serem utilizadas. A participação na pesquisa foi voluntária e os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde.

### **3.2. Critérios de inclusão e exclusão (Faveri et al. 2009)**

#### Critérios de inclusão (grupo com periodontite crônica generalizada)

- Idade igual ou superior a 30 anos;
- Mínimo de 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares e os dentes com indicação de extração;
- Mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal, não contíguo, com PS e nível clínico de inserção (NCI)  $\geq$  5 mm, preferencialmente distribuídos em sextantes distintos.
- Mínimo de 30% dos sítios com PS e NCI  $\geq$  4mm e com SS.

#### Critérios de inclusão (grupo periodontalmente saudável)

- Idade igual ou superior a 30 anos;
- Mínimo de 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares e os dentes com indicação de extração;
- Nenhum sítio com PS e/ou NCI  $\geq$  3mm e SS não superior a 10% dos sítios.

#### Critérios de exclusão

- Fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos.
- Gestantes ou lactantes;
- Histórico de tratamento periodontal prévio;
- Histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- Uso prolongado de medicação antiinflamatória;
- Histórico de uso de antissépticos orais nos últimos seis meses;
- Doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento, como próteses de válvulas cardíacas;
- Relato de alergia ao MTZ e/ou à penicilina (para os grupos com periodontite crônica)

### 3.3. Delineamento experimental

No início do estudo todos os voluntários receberam monitoramento clínico e microbiológico. Após a coleta do biofilme para o estudo de Associação os coordenadores do estudo (M.Fe e L.C.F.) realizaram a distribuição aleatória dos voluntários com periodontite crônica, por meio de um programa eletrônico (<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>), em dois grupos terapêuticos, como descrito a seguir (estudo de Eliminação):

**-Grupo controle (RAR): RAR + AMX placebo (500mg) + MTZ placebo (400mg) 3 vezes ao dia durante 14 dias, (n=20);**

**- Grupo teste (MTZ+AMX): RAR + MTZ (400mg) e AMX (500mg) 3 vezes ao dia, durante 14 dias, (n=20);**

Os dois grupos terapêuticos receberam terapia periodontal básica (ver item 3.4.1) e a seguir cada paciente recebeu o tratamento do grupo em que foi alocado (ver itens 3.4.2 e 3.4.3). Os voluntários foram monitorados novamente aos 3 meses e 1 ano pós-terapias. O estudo foi duplo-cego, ou seja, nenhum dos pesquisadores envolvidos, incluindo o bioestatístico, pesquisadores e voluntários tinham conhecimento sobre a alocação das diferentes terapias. O código de sigilo foi quebrado apenas após a análise estatística.

### 3.4. Procedimentos terapêuticos

#### 3.4.1 Terapia periodontal básica (fase higiênica)

Após o registro das medidas clínicas os voluntários com periodontite crônica foram submetidos a uma ou duas sessões de adequação do meio bucal que incluíam instrução de higiene bucal (IHB), raspagem supragengival de todos os dentes com instrumentos manuais, remoção de excesso de restaurações, selamento provisório das lesões cáries cavitadas, curativos endodônticos e exodontias. Durante as sessões de IHB, os voluntários 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). Esse dentífrício foi escolhido devido a sua



comprovada eficácia clínica no controle da placa supragengival (Mateu et al. 2008).

#### 3.4.2 RAR

Após a fase higiênica, os voluntários receberam entre quatro e seis sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sob anestesia local. Estas sessões de RAR foram realizadas por duas alunas do curso de mestrado em Odontologia com área de concentração em periodontia da Universidade Guarulhos, (G.M.S.S. e J.A.V.M.) com duração de aproximadamente 1 hora, e foram finalizadas em 14 dias.

Os dois examinadores realizaram os exames clínicos e também a terapia de RAR, porém aquele examinador responsável pela execução da RAR não realizou os exames clínicos no mesmo indivíduo. As necessidades adicionais de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da clínica odontológica da própria universidade.

#### 3.4.3 Administração de MTZ e AMX sistêmicos e placebos

Voluntários do grupo teste receberam RAR associada à 1,2 g/dia de MTZ (400mg de 8/8 horas) e 1,5 g/dia de AMX (500mg de 8/8 horas) via oral por 14 dias. A administração dos antibióticos sistêmicos foi iniciada no mesmo dia da primeira sessão de RAR. Os voluntários do grupo controle receberam comprimidos de placebo e foram orientados a seguir o mesmo regime dos voluntários que receberam as substâncias ativas. O antibiótico e o placebo foram manipulados especialmente para este estudo na Farmácia de Manipulação Pharmedica (São Paulo, SP, Brasil). Todas os comprimidos (medicação ou placebo) apresentavam a mesma coloração e tamanho e foram estocados em frascos plásticos leitosos com 21 unidades, devidamente codificados. Quanto ao controle da ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, os voluntários foram orientados a retornar na semana seguinte à clínica de Odontologia da UnG, trazendo o frasco vazio para depois receber outro frasco contendo a

mesma medicação. Além disso, eles também foram monitorados de 4 em 4 dias, pessoalmente ou via telefone, por um aluno de iniciação científica.

### **3.5. Avaliação clínico-periodontal**

O exame clínico-periodontal foi efetuado no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico periodontal. Dois examinadores/terapeutas (G.M.S.S. e J.A.V.M.) participaram de um exercício de calibração com o objetivo de conseguir a máxima reprodutibilidade nas medições realizadas por cada um deles e entre eles, e o erro médio padrão para os parâmetros clínicos (PS e NCI) foi calculado. A variabilidade inter-examinador foi 0,23 mm para PS e 0,25 mm para NCI. A média de variabilidade intra-examinador foi 0,19 mm para PS e 0,24 mm para NCI para o examinador 1 (G.M.S.S) e 0,21mm para PS e 0,26 mm para NCI para o segundo examinador (J.A.V.M.). Para as variáveis categóricas a média do nível de concordância para cada examinador e entre eles foi superior a 92% (Teste Kappa). Em cada indivíduo participante, um examinador realizava todas as avaliações clínicas e o outro examinador realizava todo o tratamento.

As mensurações clínicas foram realizadas no início do estudo de Associação para os voluntários com periodontite crônica e periodontalmente saudáveis, e aos 3 meses e 1 ano pós-terapias para os voluntários com periodontite crônica. Foram examinados 6 sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes presentes (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 (Ainamo & Bay, 1975): presença (score 1) ou ausência (score 0) de placa supragengival visível;
- Índice de Sangramento Gengival (Ainamo & Bay, 1975): presença (score 1) ou ausência (score 0) de sangramento da gengiva marginal, após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival;
- PS: distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;

- NCI: distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;
- 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.

### **3.6. Avaliação microbiológica**

#### **3.6.1 Seleção dos sítios-testes**

Foram selecionados nove sítios de cada voluntário com periodontite crônica, distribuídos de acordo com a PS inicial nas seguintes categorias (3 sítios por categoria): rasas ( $PS \leq 3\text{mm}$ ), intermediárias ( $PS 4-6\text{ mm}$ ), e profundas ( $PS \geq 7\text{mm}$ ). Quando um dos 3 sítios profundos não foi encontrado, o mesmo foi substituído por um sítio intermediário. Estes sítios estavam localizados em faces dentais interproximais não-contíguas, e preferencialmente distribuídos entre os quatro quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados. Amostras de biofilme foram coletadas no início do estudo, em 3 meses e em 1 ano pós-terapias.

Nos indivíduos periodontalmente saudáveis foram coletadas amostras de nove sítios subgingivais, escolhidos aleatoriamente por meio de um programa eletrônico (<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>) Todos os sítios apresentavam  $PS \leq 3\text{mm}$  e não sangraram à sondagem.

#### **3.6.2 Coleta das amostras de biofilme subgingival**

Após a remoção de cálculo e biofilme supragingivais, as amostras de biofilme subgingival foram retiradas com curetas Gracey do tipo minifive 11-12 esterilizadas, posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único golpe de raspagem no sentido ápico-coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em microtubos plásticos individuais contendo  $150\mu\text{L}$  de solução

tampão TE (10 mM Tris-HCL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 mM EDTA (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil), pH 7,6, e a estas foi acrescentado 100µL de NaOH (Labsynth) a 0,5M para manter a integridade do DNA bacteriano por um maior período de tempo. Esses microtubos plásticos foram previamente identificados com o código do indivíduo, data e sítio de coleta e foram armazenados a -20°C até as amostras serem analisadas por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da UnG.

### 3.6.3 Seleção das espécies bacterianas avaliadas e confecção das sondas de DNA

As sondas genômicas foram preparadas para as 40 espécies bacterianas associadas com saúde e doença periodontal por Socransky et al. (1998, 2002) (Tabela 1) e 39 espécies, até o momento não comprovadamente associadas com a etiologia das periodontites, que serão chamadas de “novas” espécies (Tabela 2). A seleção das “novas” espécies bacterianas foi feita com base nos seguintes parâmetros: 1) Revisão Sistemática da literatura sobre o peso atual da evidência para novos patógenos periodontais, (Perez-Chaparro et al. submetido) 2) espécies bacterianas de interesse médico, 3) comunicação pessoal com Profs. Sigmund Socransky e Flavia Teles.

A Revisão Sistemática concluiu que 34 “novas” espécies bacterianas podem vir a ser consideradas como patógenos periodontais, sendo que 17 apresentam forte evidência na literatura. Dessas 34, 22 são cultiváveis, ou seja, passíveis de serem avaliadas por meio do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*; e 12 ainda não foram cultivadas. Dentre as 22 espécies cultiváveis conseguimos obter DNA de 9 para a confecção de sondas. No entanto, 3 delas foram posteriormente excluídas pelo fato das sondas não terem funcionado de forma adequada na fase de testes preliminares: *Eubacterium saphenum*, *Selenomonas sputigena* e *Acinetobacter baumannii*. Logo, as seis espécies bacterianas incluídas inicialmente no presente estudo foram: *Dialister pneumosintes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Eubacterium brachy*, *Filifactor alocis* e *Porphyromonas endodontalis*.

Na etapa seguinte, optamos por incluir espécies que tivessem sido apontadas em pelo menos um artigo como possivelmente relacionadas à etiologia da periodontite crônica ou agressiva. Foram selecionadas então outras sete espécies: *Atopobium rimae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Prevotella oris*, *Rothia dentacariosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

As demais 26 espécies foram incluídas por terem sido apontadas como patógenos ou possíveis patógenos em infecções extra-orais, ou consideradas como “candidatos” a patógenos por dois pesquisadores de renome na área de Ecologia Oral, Profs. Sigmund Socransky e Flavia Teles.

A espécie *Streptococcus pneumoniae* foi incluída unicamente no estudo de eliminação, pois o DNA dessa espécie foi obtido apenas após a análise das amostras de biofilme dos voluntários saudáveis. Sendo assim, 39 “novas” espécies foram avaliadas no estudo de associação e 40 no estudo de eliminação.

Um µg de DNA bacteriano de cada uma das espécies foi marcado com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). Após o preparo todas as sondas foram testadas em diferentes diluições com o objetivo de padronizar a concentração ideal de utilização de cada uma delas.

**Tabela 1.** Relação das espécies bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (Socransky et al., 1998; Socransky & Haffajee, 2002).

Espécies	Cepas	Espécies	Cepas
<b>Actinomyces</b>		<b>Complexo Laranja (cont.)</b>	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 <sup>a</sup>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>nucleatum</i>	25586 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 <sup>a</sup>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>polymorphum</i>	10953 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	12104 <sup>a</sup>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>vincentii</i>	49256 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces oris</i>	43146 <sup>a</sup>	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 <sup>a</sup>
<b>Complexo Roxo</b>		<i>Parvimonas micra</i>	33270 <sup>a</sup>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 <sup>a</sup>	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 <sup>a</sup>
<i>Veillonella parvula</i>	10790 <sup>a</sup>	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 <sup>a</sup>
<b>Complexo Amarelo</b>		<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 <sup>a</sup>	<b>Complexo Vermelho</b>	
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 <sup>a</sup>	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 <sup>a</sup>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 <sup>a</sup>	<i>Treponema denticola</i>	B1 <sup>b</sup>
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 <sup>a</sup>	<b>Outras Espécies</b>	
<b>Complexo Verde</b>		<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 <sup>a</sup>
<i>Aggregatibacter</i>	43718 <sup>a</sup>	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 <sup>a</sup>
<i>actinomycetemcomitans</i> a + b	29523 <sup>a</sup>	<i>Leptotrichia buccalis</i>	4201 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 <sup>a</sup>	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 <sup>a</sup>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 <sup>a</sup>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612 <sup>a</sup>	<i>Propionibacterium acnes</i> I + II	11827 <sup>a</sup>
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 <sup>a</sup>		11828 <sup>a</sup>
<b>Complexo Laranja</b>		<i>Selenomonas noxia</i>	43541 <sup>a</sup>
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 <sup>a</sup>	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 <sup>a</sup>
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 <sup>a</sup>	<i>Treponema socranskii</i>	S1 <sup>b</sup>
<i>Campylobacter showae</i>	51146 <sup>a</sup>		
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 <sup>a</sup>		

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection); <sup>b</sup> Forsyth Institute

**Tabela 2.** Relação das “novas” espécies bacterianas utilizadas para a confecção das sondas de DNA.

<i>Espécies</i>	Cepas	<i>Espécies</i>	Cepas
<i>Actinomyces meyeri</i>	35568	<i>Helicobacter pylori</i>	43504
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	29242	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
<i>Atopobium rimae</i>	49626	<i>Mobiluncus curtissii</i>	35241
<i>Bacteroides fragilis</i>	25285	<i>Nectria haematococca</i>	48626
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	33387	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	21824
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	<i>Neisseria meningitidis</i>	13077
<i>Cronobacter sakazakii</i>	12868	<i>Neisseria polysaccharea</i>	43768
<i>Dialister pneumosintes</i>	68427	<i>Neisseria sicca</i>	29256
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406
<i>Enterobacter cloacae</i>	10699	<i>Prevotella oris</i>	33573
<i>Enterobacter gergoviae</i>	33028	<i>Rothia dentocariosa</i>	17931
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	<i>Serratia marcescens</i>	13477
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	<i>Spiroplasma ixodetis</i>	33835
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	<i>Staphylococcus aureus</i>	33591
<i>Escherichia coli</i>	10799	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14990
<i>Eubacterium brachy</i>	33089	<i>Staphylococcus warneri</i>	27836
<i>Eubacterium limosum</i>	8486	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619
<i>Filifactor alocis</i>	35896	<i>Streptococcus pyogenes</i>	12344
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	25286	<i>Veillonella dispar</i>	17748
<i>Haemophilus influenzae</i>	33533	<i>Vibrio nereis</i>	33895

**ATCC (American Type Culture Collection)**

A espécie *Streptococcus pneumoniae* foi incluída apenas no estudo de Eliminação.

### 3.6.4 Avaliação das amostras pelo *Checkerboard DNA-DNA hybridization*:

#### 3.6.4.1 Primeira hibridização (40 espécies/painel tradicional) (Socrasny et al. 1998, Socransky & Haffajee 2002) (Tabela 1)

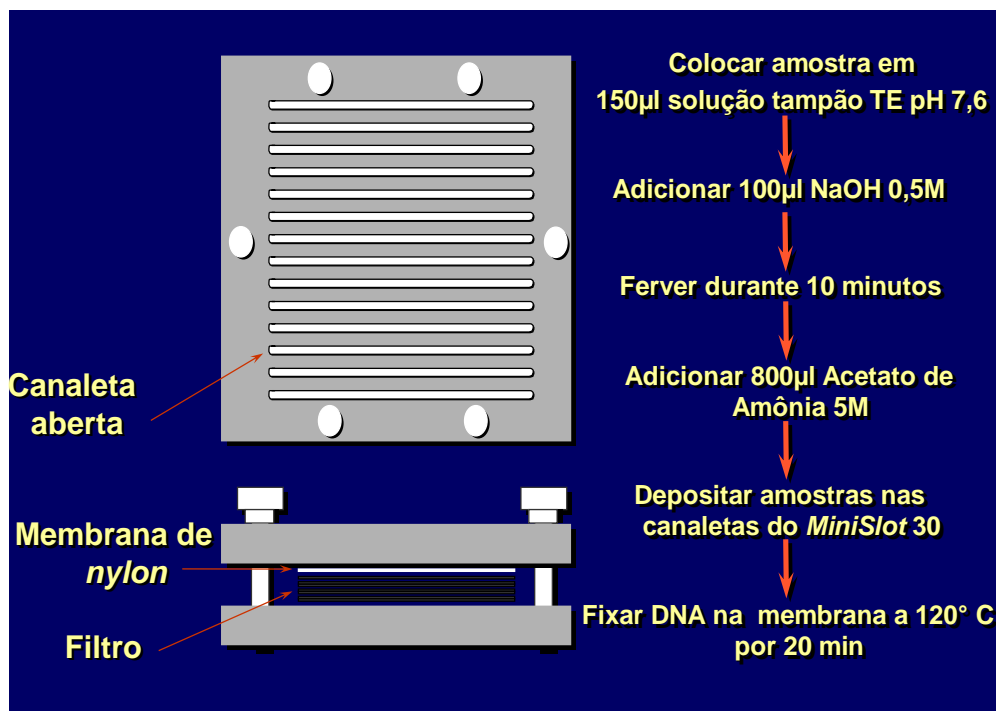
As suspensões contidas nos microtubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA – Figura 2) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies dos 80 microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a  $10^5$  e  $10^6$  células, ou seja, 1  $\eta$ g e 10  $\eta$ g de DNA de cada espécie, respectivamente (Socransky et al., 1994; Haffajee et al., 1997). A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) (1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0, 25mM de fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma Aldrich Química Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunitics, Cambridge, MA, EUA – Figura 2) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20  $\eta$ g/mL, em 130  $\mu$ L de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham Biosciences do Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C.



### Detecção das espécies

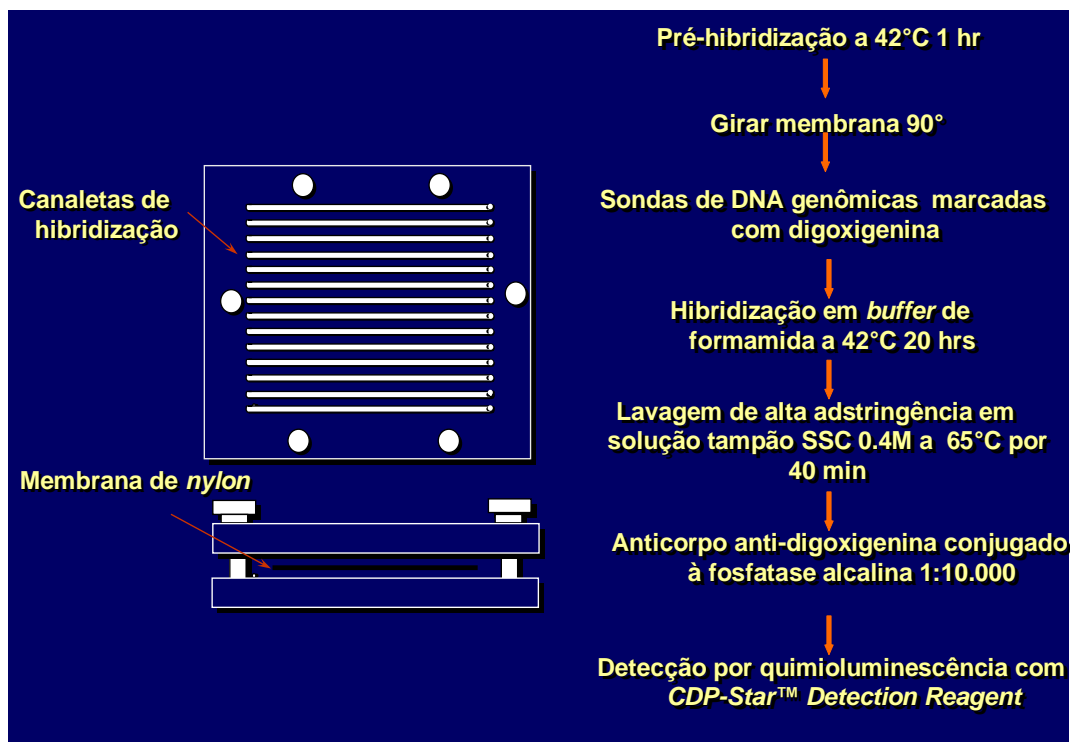
Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetcs), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche Químicos e Farmacêuticos S. A., São Paulo, SP, Brasil) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

Para a detecção dos sinais a membrana foi incubada por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora contendo substrato para fosfatase alcalina, *CDP-Star™ Detection Reagent* (Amersham). Em seguida, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30 x 40 cm (Konex, São Paulo, SP, Brasil), sob um filme radiográfico 18 x 24 cm (Agfa Gevaert, NV, Bélgica) por aproximadamente 40 minutos. O filme foi posteriormente revelado (Figura 4) manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), mantidas a temperatura de 20°C.



**Figura 1.** Representação gráfica do Minislot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

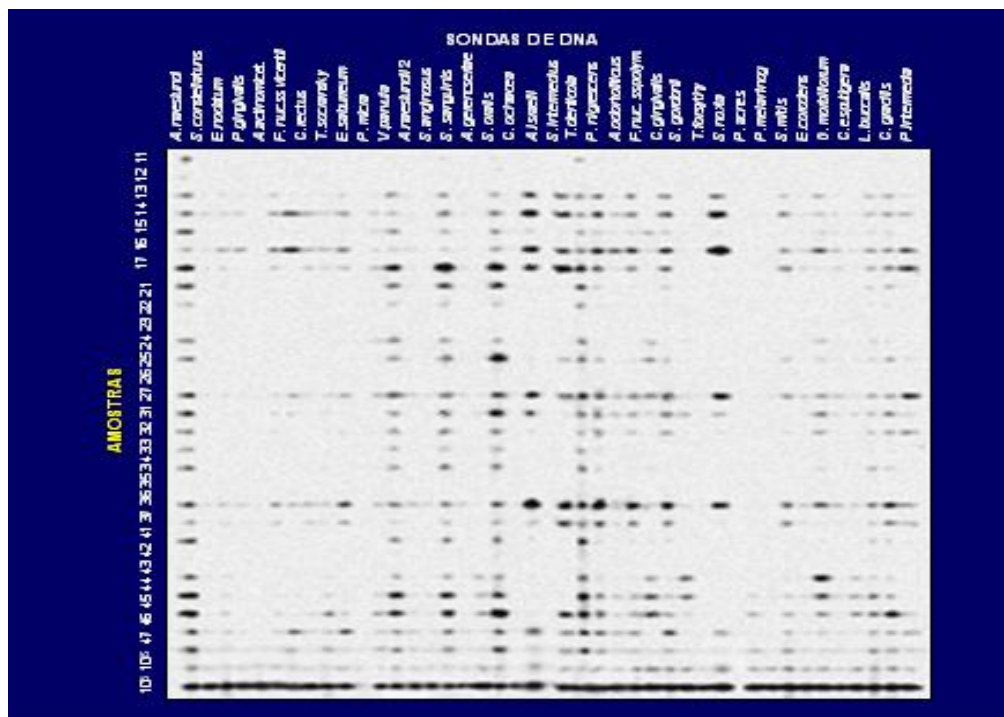
A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em intensidade, ao sinal produzido pela mesma sonda nas 2 linhas de controles contendo  $10^5$  e  $10^6$  bactérias. Desta forma, o número 0 foi registrado quando não houve detecção do sinal; 1 equivaleu a um sinal menos intenso que o controle de  $10^5$  células; 2 equivaleu a  $10^5$  células; 3 entre  $10^5$  e  $10^6$  células; 4 a aproximadamente  $10^6$  células e 5 mais de  $10^6$  células (Tabela 3). Estes registros foram utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nas diferentes amostras avaliadas.



**Figura 2.** Representação gráfica do *Miniblotter 45* (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

**Tabela 3.** Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival.

ÍNDICE	NÍVEL DO MICRORGANISMO	CONTAGEM
0	Não detectado	0
1	Menos de 10 <sup>5</sup> células	10.000
2	Aproximadamente 10 <sup>5</sup> células	100.000
3	Entre 10 <sup>5</sup> e 10 <sup>6</sup> células	500.000
4	Aproximadamente 10 <sup>6</sup> células	1.000.000
5	Mais de 10 <sup>6</sup> células	10.000.000



**Figura 3.** Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*).

#### 3.6.4.2 Segunda hibridização (40 “novas” espécies bacterianas) (Tabela 2)

Como explicitado anteriormente, o *Miniblotter* 45 utilizado na pesquisa possibilita a utilização de apenas 40 sondas de DNA em cada processo de hibridização. Dessa forma, para viabilizar o estudo das 79 espécies bacterianas de interesse na pesquisa utilizamos um protocolo de “resondagem”, que consiste em utilizar uma solução apropriada para remoção das sondas empregadas na primeira hibridização para permitir que uma nova série de sondas sejam utilizadas. Após reidratar as membranas com água ultra-pura, as primeiras sondas foram removidas através de dois ciclos de lavagem de 10 minutos cada em Incubadora com agitação (Nova Ética, Vargem Grande, São Paulo, Brasil), imersas em 100 ml de uma solução ‘*stripping*’ (3.4mM Sulfato de Sódio e 0.4M NaOH, Sigma). Após a remoção das sondas utilizadas no primeiro processo de hibridização, todas as etapas de pré-hibridização, hibridização, lavagem e detecção foram repetidas conforme descrito no item 3.6.4.1. Nessa fase foram

utilizadas as sondas de DNA para as “novas” espécies bacterianas descritas na Tabela 2.

### **3.7. Análise estatística**

#### 3.7.1. Estudo de Associação

##### 3.7.1.1 Dados clínicos

A média das medidas clínicas de PS e NCI, assim com a média do percentual de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, SS e SUP foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste de Mann–Whitney. O teste Qui-quadrado foi utilizado para a variável gênero. A significância estatística foi estabelecida em 5%.

##### 3.7.1.2. Dados microbiológicos

Os dados microbiológicos das amostras de biofilme subgengival dos indivíduos com periodontite crônica ou saúde periodontal foram expressos em contagem (níveis) e prevalência das 39 “novas” espécies bacterianas avaliadas. Inicialmente foi computado o nível médio e a prevalência de cada espécie bacteriana por sítio e a seguir por indivíduo e por grupo. As diferenças significativas entre os grupos experimentais foram avaliadas por meio do teste Mann-Whitney. Esse mesmo padrão de análise foi realizada incluindo apenas os dados microbiológicos dos sítios inicialmente rasos, com  $PS \leq 3\text{mm}$ . Todas as análises foram realizadas com e sem ajustes para comparações múltiplas, com a significância estatística estabelecida em 5%. Nas comparações ajustadas foi utilizado o valor de  $p < 0,00125$ , como proposto por Socransky et al. (1991).

#### 3.7.2. Estudo de Eliminação

##### 3.7.2.1 Cálculo amostral

O tamanho amostral ideal para garantir uma potência adequada a esse estudo clínico controlado foi calculado com base nos seguinte parâmetro: diferença de

pelo menos 4 sítios com PS  $\geq 5$ mm entre os grupos (Lang & Tonetti, 2003) e assumindo um desvio padrão de 5 sítios (Mestnik et al., 2010). Baseado nesse cálculo, uma amostragem de 20 voluntários por grupo seria necessária para se alcançar uma potência de 80% com  $\alpha=0,05$ .

#### 3.7.2.2. Dados clínicos

A média das medidas clínicas de PS e NCI, assim como a média do percentual de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem, supuração e PS  $\geq 5$ mm foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. As diferenças significativas dentro de cada grupo entre o início do estudo e 1 no foram avaliadas utilizando o teste Wilcoxon. O Mann-Whitney foi utilizado para examinar diferenças entre os 2 grupos terapêuticos nos diferentes tempos experimentais. A significância estatística foi estabelecida em 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 3.7.2.3. Dados microbiológicos

Os dados microbiológicos das amostras de biofilme subgengival dos indivíduos com periodontite dos dois grupos terapêuticos foram expressos em contagem (níveis), prevalência e proporção. Para comparar os níveis médios de cada espécie bacteriana estudada, os dados foram expressos como contagem  $\times 10^5$  em cada sítio e avaliados por voluntário e depois entre voluntários, dentro de cada grupo, em cada tempo do estudo. De maneira semelhante a proporção de cada espécie foi computada por sítio, e depois calculadas as médias entre os sítios em cada indivíduo, e então entre os voluntários de um mesmo grupo em cada tempo experimental. As diferenças significativas entre os dois grupos em cada tempo experimental foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças dentro de cada grupo ao longo do estudo (início do estudo, 3 meses e 1 ano pós-terapia) foram avaliadas por meio do teste Friedman. As diferenças significativas dentro de cada grupo entre o início do estudo e 1 ano foram avaliadas pelo teste Wilcoxon. As análises foram realizadas com e sem ajustes para comparações múltiplas, com a significância estatística estabelecida em 5%. Nas comparações ajustadas foi considerado o valor de  $p < 0,00125$ , como proposto por Socransky et al. (1991).

### **3.8. Parâmetros utilizados para a categorização dos possíveis “novos” patógenos periodontais:**

Os resultados dos estudos de Associação e Eliminação foram agrupados e as espécies bacterianas foram categorizadas em dois níveis de evidência para o status de “patógeno periodontal”, como descrito a seguir:

1) Evidência forte – quando a espécie encontrava-se significativamente elevada nos indivíduos com periodontite crônica em comparação aos periodontalmente saudáveis nos 5 parâmetros avaliados (percentual de voluntários colonizados, média percentual de sítios colonizados em todos os sítios e em sítios rasos, média de contagem em todos os sítios e em sítios rasos.) Além disso, a espécie deveria ter sido reduzida em percentual de sítios colonizados e em níveis por pelo menos uma das terapias.

Para as avaliações de sítios rasos no estudo de Associação, e para o estudo de Eliminação foram consideradas as significâncias estatísticas ajustadas e não ajustadas para comparações múltiplas, enquanto que para os outros parâmetros foram consideradas apenas as significâncias ajustadas.

2) Evidência moderada – quando a espécie encontrava-se significativamente elevada nos indivíduos com periodontite crônica em comparação aos periodontalmente saudáveis em pelo menos 4 dos 5 parâmetros avaliados no estudo de Associação, considerando-se a estatística ajustada e não ajustada. Além disso, a espécie deveria ter sido reduzida em percentual de sítios colonizados e/ou níveis por pelo menos uma das terapias.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Estudo de Associação

A Tabela 4 apresenta as características demográficas e clínicas dos grupos de saúde periodontal e periodontite crônica no início do estudo. Como esperado, todos os parâmetros clínicos estavam significativamente aumentados no grupo de voluntários com periodontite crônica em relação ao grupo periodontalmente saudável.

**Tabela 4.** Parâmetros demográficos e clínicos nos grupos de periodontite crônica e saúde periodontal.

	Saúde	Periodontite	Mann-Whitney
	(n=17)	(n=40)	
	Média ± DP	Média ± DP	(p)
<b>Gênero F/M</b>	10/7	28/12	>0,05
<b>Idade</b>	40,6 ± 4,1	45,6 ± 8,1	0,5674
<b>PS</b>	1,96 ± 0,6	3,82 ± 0,71	0,0007
<b>NIC</b>	1,04 ± 0,5	4,23 ± 0,93	0,0099
<b>IP</b>	34,5 ± 9,9	84,1 ± 12,3	0,0103
<b>IG</b>	4,5 ± 2,9	29,2 ± 11,1	0,0029
<b>SS</b>	6,1 ± 3,2	81,1 ± 14,1	0,0004
<b>SUP</b>	0,0 ± 0,0	2,5 ± 3,2	0,0000

A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). DP, desvio padrão; PC, periodontite crônica; PS profundidade de sondagem; NIC, nível clínico de inserção; IP, índice de placa; IG, índice de sangramento gengival; SS, índice de sangramento à sondagem; SUP, supuração.

A Tabela 5 apresenta o percentual de participantes colonizados pelas espécies bacterianas avaliadas nesse estudo. Oito espécies (*A. rimae*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter gergoviae*, *E. faecalis*, *Eubacterium limosum*, *F. alocis*, *H. influenzae*, *Staphylococcus warneri*) colonizaram um percentual significativamente maior de voluntários com periodontite crônica em relação aos periodontalmente saudáveis, considerando-se a estatística ajustada para comparações múltiplas. As espécies *H. influenzae* e *E. limosum* não foram detectadas em nenhum indivíduo com saúde periodontal.



**Tabela 5:** Percentual de participantes colonizados pelas espécies bacterianas avaliadas nos grupos de saúde periodontal e periodontite crônica.

<b>Espécies</b>	<b>Saúde</b>	<b>Periodontite</b>	<b>Qui-quadrado (p)</b>
<i>Actinomyces meyeri</i>	76,5	97,5	0,0242*
<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	88,2	82,5	0,7099
<i>Atopobium rima</i>	23,5	80,0	0,0002*
<i>Bacteroides fragilis</i>	76,5	75,0	0,9567
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	82,4	92,5	0,3492
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	94,1	100	0,2900
<i>Cronobacter sakazakii</i>	58,8	100	0,0000*
<i>Dialister pneumosintes</i>	88,2	97,5	0,2092
<i>Enterobacter aerogenes</i>	94,1	100	1,0000
<i>Enterobacter cloacae</i>	41,2	80,0	0,0060*
<i>Enterobacter gergoviae</i>	5,9	67,5	0,0000*
<i>Enterococcus faecalis</i>	58,8	97,5	0,0000*
<i>Enterococcus faecium</i>	94,1	100	1,0000
<i>Enterococcus hirae</i>	88,2	100	0,5100
<i>Escherichia coli</i>	82,4	100	0,0200*
<i>Eubacterium brachy</i>	82,4	92,5	0,3492
<i>Eubacterium limosum</i>	0,0	82,5	0,0000*
<i>Filifactor alocis</i>	47,1	90,0	0,0010*
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	52,9	90,0	0,0035*
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,0	75,0	0,0000*
<i>Helicobacter pylori</i>	88,2	92,5	0,6289

<b>Espécies</b>	<b>Saúde</b>	<b>Periodontite</b>	<b>Qui-quadrado (p)</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	94,1	100	0,2900
<i>Mobiluncus curtissii</i>	94,1	90,0	1,0000
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	94,1	90,0	1,000
<i>Neisseria meningitidis</i>	88,2	92,5	0,6289
<i>Neisseria polysaccharea</i>	88,2	87,5	1,0000
<i>Neisseria sicca</i>	94,1	92,5	1,0000
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	88,2	95,0	0,5748
<i>Prevotella oris</i>	88,2	95,0	0,5748
<i>Rothia dentocariosa</i>	76,5	95,0	0,0583
<i>Serratia marcescens</i>	88,2	97,5	0,2000
<i>Spiroplasma ixodetis</i>	41,2	90,0	0,0020*
<i>Staphylococcus aureus</i>	58,8	95,0	0,0018*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	88,2	97,5	0,2000
<i>Staphylococcus warneri</i>	70,6	100	0,0000*
<i>Streptococcus pyogenes</i>	82,4	100	0,0232*
<i>Veillonella díspar</i>	64,7	97,5	0,0019*
<i>Vibrio nereis</i>	47,1	87,5	0,0023*

A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Qui-quadrado ( $p < 0.05$ ). (\*) indica significância estatística ajustada para comparações múltiplas; (\*) indica significância estatística não ajustada.

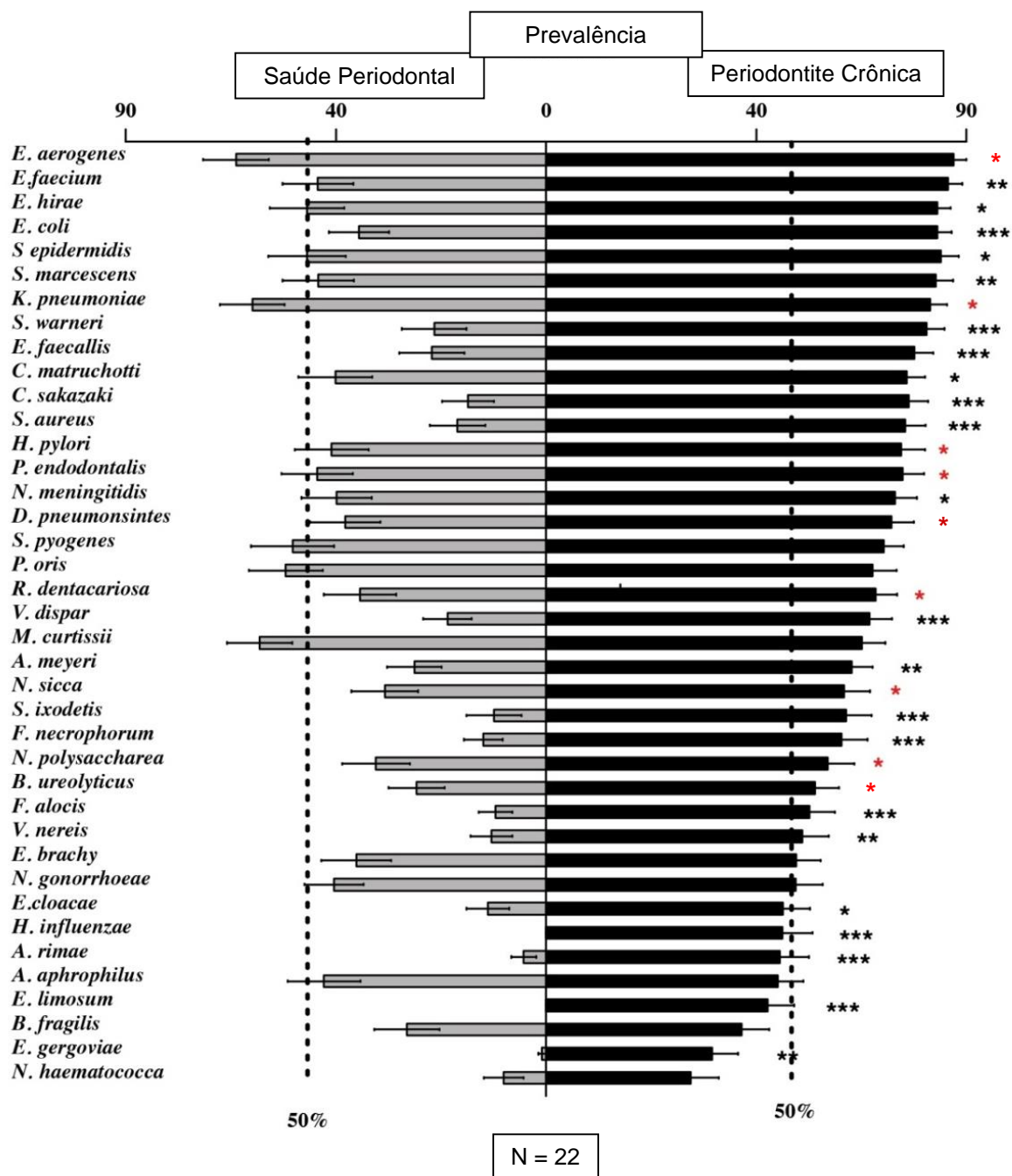
A Figura 4 (página 43) ilustra a média percentual de sítios periodontais colonizados pelas novas espécies bacterianas estudadas nos grupos de saúde e periodontite crônica. Vinte e duas espécies estavam presentes em um percentual

significativamente maior de sítios dos voluntários portadores de periodontite crônica, em comparação com os sítios de voluntários periodontalmente saudáveis, considerando-se a estatística ajustada para comparações múltiplas. Foram elas: *Actinomyces meyeri*, *A. rimae*, *Corynebacterium matruchotii*, *C. sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *E. gergoviae*, *E. faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *E. coli*, *E. limosum*, *F. alocis*, *Fusobacterium necrophorum*, *H. influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Serratia marcescens*, *Spiroplasma ixodetis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *Veillonella díspar* e *Vibrio nereis*.

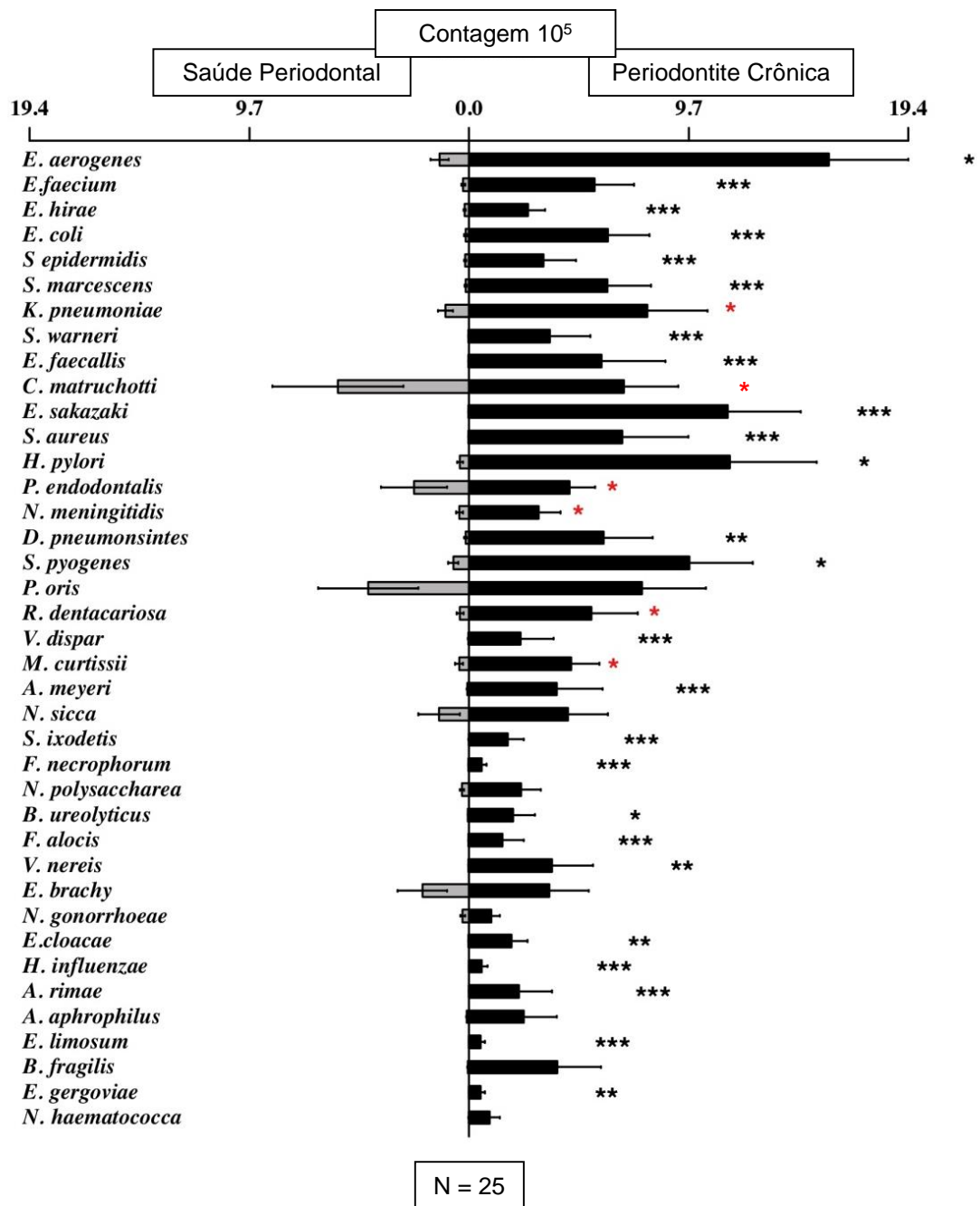
A Figura 5 (página 44) apresenta a média de contagem (níveis) das espécies avaliadas. A maior parte delas - 25 espécies - apresentou níveis maiores, com significância estatística na análise ajustada para comparações múltiplas, no grupo teste do que no grupo controle. Foram elas: *A. meyeri*, *A. rimae*, *Bacteroides ureolyticus*, *C. sakazakii*, *D. pneumosintes*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. gergoviae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. coli*, *E. limosum*, *F. alocis*, *F. necrophorum*, *H. influenzae*, *Helicobacter pylori*, *S. marcescens*, *S. ixodetis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *Streptococcus pyogenes*, *V. díspar* e *V. nereis*.

As Figuras 6 e 7 (página 45 e 46) apresentam, respectivamente, o percentual de sítios colonizados e a média de contagem das espécies avaliadas nos dois grupos, para os sítios rasos ( $PS \leq 3$  mm). *E. faecalis* e *S. warneri* estavam elevadas nos voluntários com periodontite para esses dois parâmetros. Já *C. sakazakii* estava presente em um maior percentual de sítios dos voluntários com periodontite. Essas diferenças foram estatisticamente significativas nas análises ajustadas para comparações múltiplas. Quando a análise estatística não ajustada foi considerada, observou-se que outras 11 espécies (*A. rimae*, *E. gergoviae*, *E. faecium*, *E. coli*, *E. limosum*, *F. alocis*, *F. necrophorum*, *H. influenzae*, *S. marcescens*, *S. ixodetis* e *S. aureus*) estavam presentes em um maior percentual de sítios nos indivíduos com periodontite crônica, e o *Aggregatibacter aphrophilus* nos periodontalmente saudáveis. Para o parâmetro de níveis, as espécies *A. aphrophilus*, *A. rimae*, *C. sakazakii*, *D. pneumosintes*, *E. gergoviae*, *E. limosum*, *F. alocis*, *H. influenzae*, *S. ixodetis* e *S. aureus* estavam aumentadas em saúde, levando em consideração o mesmo critério utilizado para prevalência em sítios rasos, ou seja, números não ajustados; enquanto 4 espécies estavam aumentadas em saúde: *E. brachy*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria polysaccharea* e *Prevotella oris*.

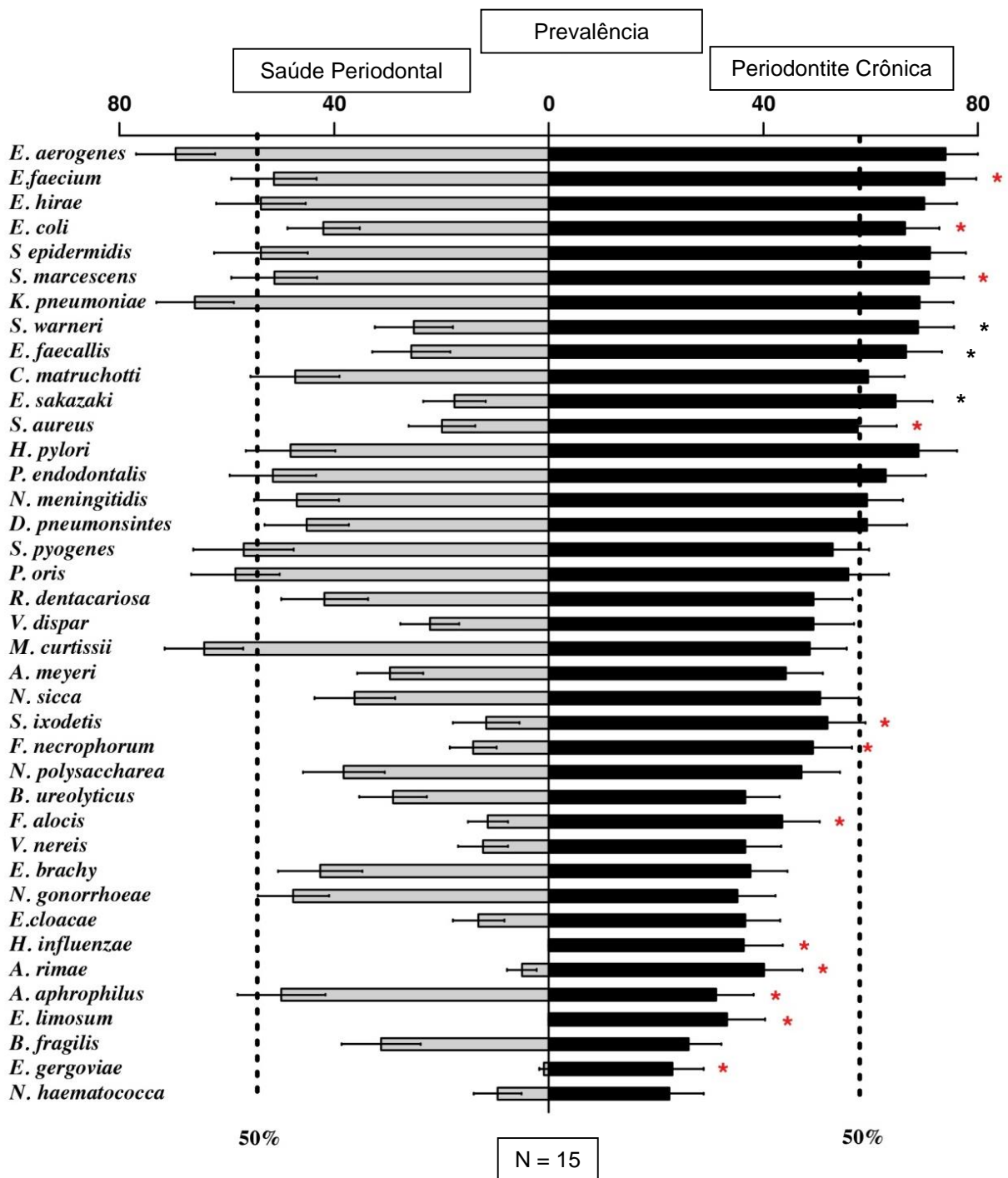
A figura 8 (página 47) apresenta as proporções das novas espécies avaliadas e das 40 espécies do painel tradicional do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* no grupo com periodontite crônica. Nota-se que patógenos periodontais conhecidos, como os três membros do complexo vermelho e algumas espécies do complexo laranja, estão entre as 20 espécies (25%) que se encontravam em maiores proporções dentre as 80 avaliadas. Algumas das 39 “novas” espécies bacterianas avaliadas, também estavam entre as 25% espécies observadas em maiores proporções. São elas: *C. sakazakii*, *E. aerogenes*, *H. pylori*, *P. endodontalis*, *Staphylococcus pneumoniae* e *S. pyogenes*.



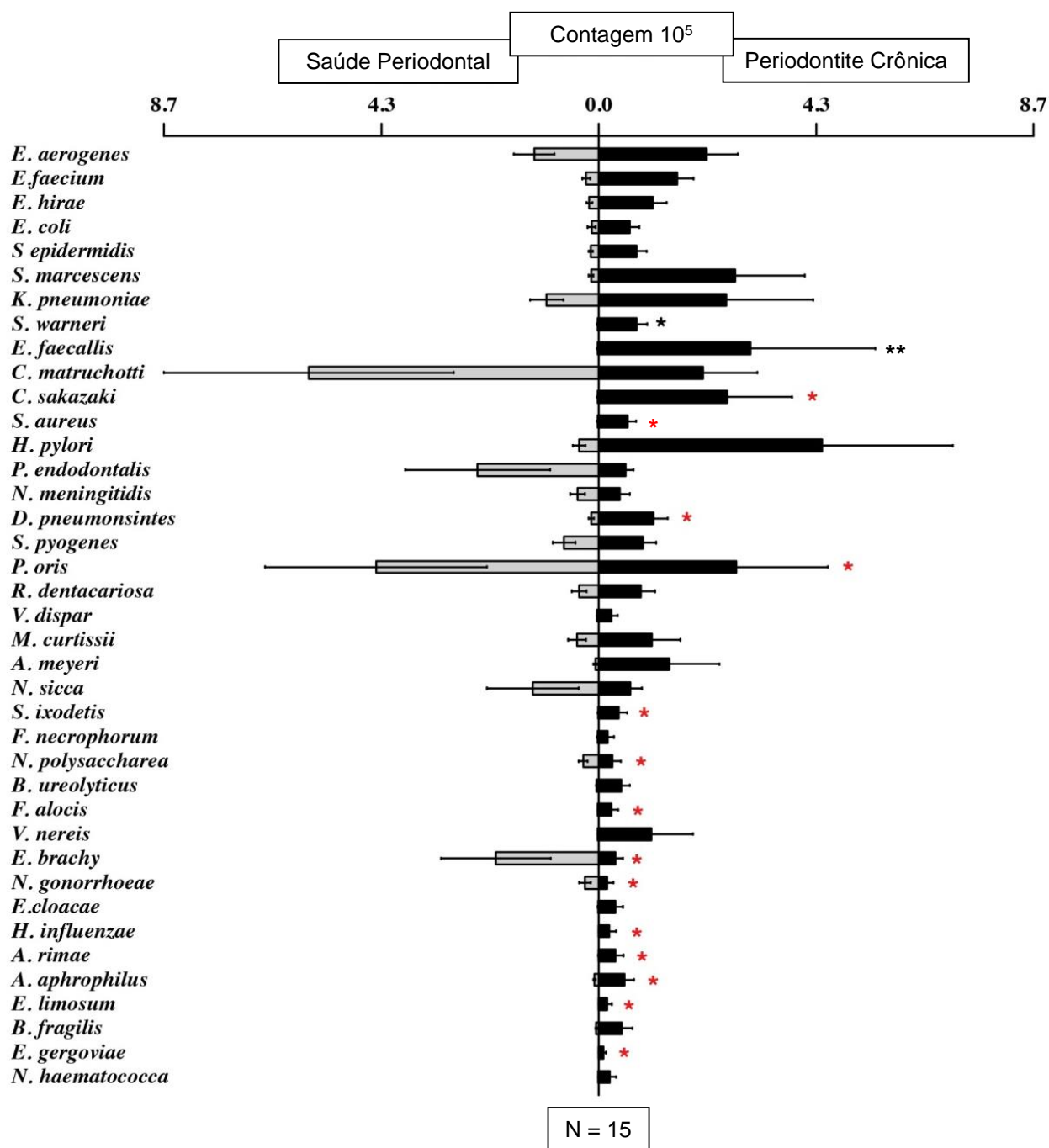
**Figura 4:** Média do percentual de sítios periodontais colonizados (prevalência) pelas espécies bacterianas avaliadas nos grupos de saúde e periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a média percentual de sítios colonizados no grupo com periodontite. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). (\*) indica significância estatística ajustada para comparações múltiplas; (\*) indica significância estatística não ajustada; (N) indica o número de espécies bacterianas mais prevalentes no grupo com periodontite crônica



**Figura 5:** Média da contagem ( $\times 10^5$ ) das espécies bacterianas avaliadas nos grupos de saúde e periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a média percentual de sítios colonizados no grupo com periodontite (Figura 4). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). (\*) indica significância estatística ajustada para comparações múltiplas; (\*\*) indica significância estatística não ajustada; (N) indica o número de espécies bacterianas com maior média de contagem no grupo com periodontite crônica

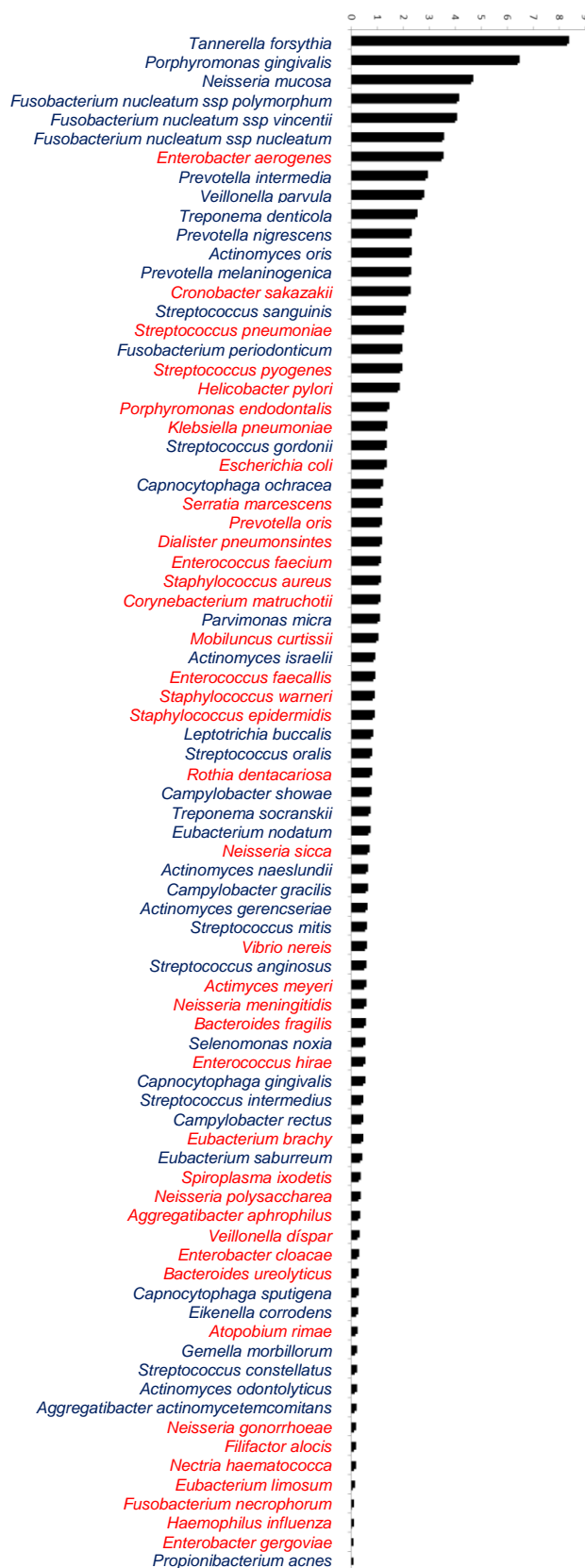


**Figura 6:** Média do percentual de sítios periodontais rasos ( $PS \leq 3\text{mm}$ ) colonizados (prevalência) pelas espécie bacteriana avaliada nos grupos de saúde e periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a média percentual de sítios colonizados no grupo com periodontite (Figura 4). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney ( $<0.05$ ). (\*) indica significância estatística ajustada para comparações múltiplas; (\*) indica significância estatística não ajustada; (N) indica o número de espécies bacterianas mais prevalentes nos sítios rasos de participantes com periodontite crônica



**Figura 7:** Média da contagem ( $\times 10^5$ ) em sítios rasos ( $PS \leq 3\text{mm}$ ) das espécies bacterianas avaliadas nos grupos de saúde e periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a média percentual de sítios colonizados no grupo com periodontite (Figura 4). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ). (\*) indica significância estatística ajustada para comparações múltiplas; (\*) indica significância estatística não ajustada; (N) indica o número de espécies bacterianas com maior média de contagem nos sítios rasos de participantes com periodontite crônica.





**Figura 8:** Média da proporção das 80 espécies bacterianas avaliadas no grupo de periodontite crônica. As espécies estão relacionadas em ordem decrescente de acordo com a proporção. Em vermelho, as “novas” espécies estudadas; em azul, as espécies do painel tradicional do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

## 4.2. Estudo de Eliminação

A Tabela 6 apresenta as características demográficas e os parâmetros clínicos dos dois grupos terapêuticos, antes e pós-terapias. Nenhum dos parâmetros diferiu significativamente entre os dois grupos no início do estudo. Após um ano, embora as melhoras clínicas tenham ocorrido em ambos os grupos terapêuticos, observa-se que o grupo que utilizou a combinação de antibióticos sistêmicos com RAR apresentou melhoras clínicas mais evidentes que o grupo que recebeu apenas RAR. Dessa forma, a média de sítios residuais com PS  $\geq$  5mm 1 ano após o início das terapias foi de  $14.5 \pm 10.2$  para o grupo de RAR e de  $4.1 \pm 4.8$  para o grupo que recebeu RAR+MTZ+AMX. O risco de progressão de doença também apresentou tendência de melhores resultados após um ano para o grupo que utilizou A terapia com antibióticos. Dos 20 voluntários desse grupo, 14 apresentaram baixo risco para futura progressão de periodontite crônica ( $\leq$  4 sítios com PS  $\geq$  5 mm) 1 ano após o tratamento; enquanto que apenas três participantes desse grupo, apresentavam alto risco para progressão de doença ( $\geq$  9 sítios com  $\geq$  5 mm). No grupo controle apenas dois voluntários atingiram o baixo risco, enquanto que 12 ainda continuavam em alto risco em 1 ano.

**Tabela 6.** Parâmetros demográficos e clínicos nos dois grupos terapêuticos no início do estudo; e em 1 ano pós-terapias para a variável primária de avaliação (sítios com PS  $\geq$  5mm) e para risco de futura progressão de doença.

Variáveis	Tempo	Grupo de tratamento		p-valor
		RAR (n=20)	RAR+ MTZ + AMX (n=20)	
Gênero F/M	Início	16/4	12/8	#0.300
Idade (anos)	Início	44,8 $\pm$ 8,9	46,2 $\pm$ 8,9	0,473
PS (mm)	Início	3,88 $\pm$ 0,64	3,70 $\pm$ 0,66	0,514
NIC (mm)	Início	4,25 $\pm$ 0,74	4,15 $\pm$ 0,89	0,375
Média do número de sítios com profundidade maior ou igual a 5 PS $\geq$ 5mm	Início	38,8 $\pm$ 21,6 <sup>A</sup>	33,0 $\pm$ 20,0 <sup>A</sup>	0,089
	1 ano	14,5 $\pm$ 10,2 <sup>B</sup>	4,1 $\pm$ 4,8 <sup>B</sup>	0,000
<i>Risco para progressão de doença:</i>				
Baixo ( $\leq$ 4 sítios PS $\geq$ 5 mm)	1 ano	2 (10,0%)	14 (70,0%)	#0,000
Moderado (5-8 sítios PS $\geq$ 5 mm)	1 ano	6 (30,0%)	3 (15,0%)	
Alto ( $\geq$ 9 sítios PS $\geq$ 5 mm)	1 ano	12 (60,0%)	3 (15,0%)	

A significância estatística das diferenças entre os grupos no início do estudo e 1 ano pós-tratamento foi avaliada pelo teste one-way ANOVA ( $p < 0,05$ ) e testes de comparação múltipla de Tukey (letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos). A significância estatística das diferenças dentro de cada grupo para a média do número de sítios com PS  $\geq$  5 mm (entre o início do estudo e 1 ano) foi avaliada usando o teste t de Student (letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos). A significância estatística das diferenças entre os grupos para os parâmetros de gênero e de Risco para progressão de doença foi avaliada usando o teste do qui-quadrado (#). RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; PS, profundidade de sondagem, NIC, nível de inserção clínico.

A Figura 9 (página 52) mostra os efeitos dos dois protocolos terapêuticos na média de sítios colonizados pelas espécies incluídas no estudo de

Associação nos três tempos pesquisados e a comparação das duas terapias quanto às alterações causadas na prevalência dessas espécies, entre o início do estudo e 1 ano. O grupo que recebeu RAR mostrou uma redução significativa na prevalência de três espécies (*H. influenzae*, *N. Meningitidis* e *P. endodontalis*), e o grupo que recebeu antibiótico sistêmico mostrou redução em 17 espécies (*B. ureolyticus*, *C. sakazakii*, *E. cloacae*, *E. hirae*, *F. necrophorum*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *N. polysaccharea*, *Neisseria sicca*, *P. endodontalis*, *R. dentacariosa*, *S. marcescens*, *S. ixodetis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri* e *S. pneumoniae*). Quando os grupos foram comparados em 1 ano, nota-se que a RAR+MTZ+AMX foi capaz de reduzir mais efetivamente do que a RAR utilizada de forma isolada, a prevalência de oito espécies bacterianas avaliadas. São elas: *A. rimae*, *C. sakazakii*, *E. hirae*, *F. alocis*, *N. gonorrhoeae*, *N. polysaccharea*, *S. aureus* e *V. nereis*. No entanto, para esse último parâmetro avaliado, as diferenças só foram observadas, considerando-se a estatística não ajustada para comparações múltiplas.

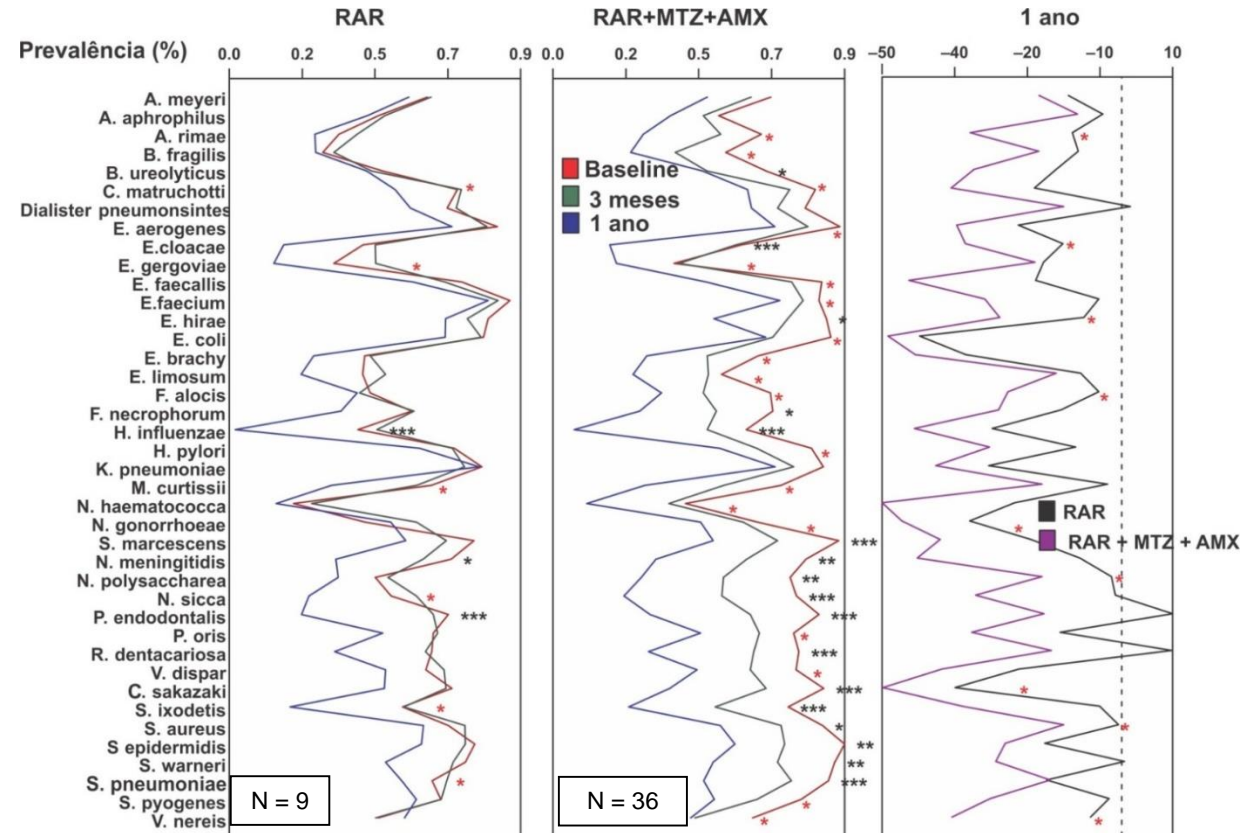
A Figura 10 (página 53) apresenta a mesma formatação e tipos de análise da Figura 9, mas para o parâmetro de média de contagem (níveis) das espécies avaliadas. O grupo que utilizou antibióticos obteve uma redução estatisticamente significativa na média da contagem de dez espécies bacterianas ao longo do estudo (*Bacteroides fragilis*, *C. sakazakii*, *E. brachy*, *E. faecalis*, *H. influenzae*, *N. sicca*, *P. endodontalis*, *R. dentacariosa*, *S. ixodetis* e *S. marcescens*); enquanto que o grupo controle mostrou redução em apenas duas espécies (*P. endodontalis* e *H. influenzae*). Na comparação entre os grupos em 1 ano, apesar que de forma geral a terapia teste tenha reduzido mais profundamente a contagem de diversas espécies em relação ao grupo controle, essa diferença somente foi significativa considerando-se a estatística ajustada para comparações múltiplas, para as espécies: *B. fragilis* e *B. ureolyticus*. Levando-se em consideração números não ajustados, outras sete espécies, podem ser incluídas nesse grupo: *C. matruchotii*, *E. brachy*, *E. gergoviae*, *N. meningitides*, *R. dentacariosa*, *S. epidermidis* e *S. warneri*.

As Figuras 11 (página 54) e 12 (página 55) apresentam os mesmos tipos de dados das Figuras 9 e 10, respectivamente, porém para as 40 espécies bacterianas tradicionalmente utilizadas no *checkerboard DNA-DNA hybridization*. As duas terapias levaram a reduções estatisticamente

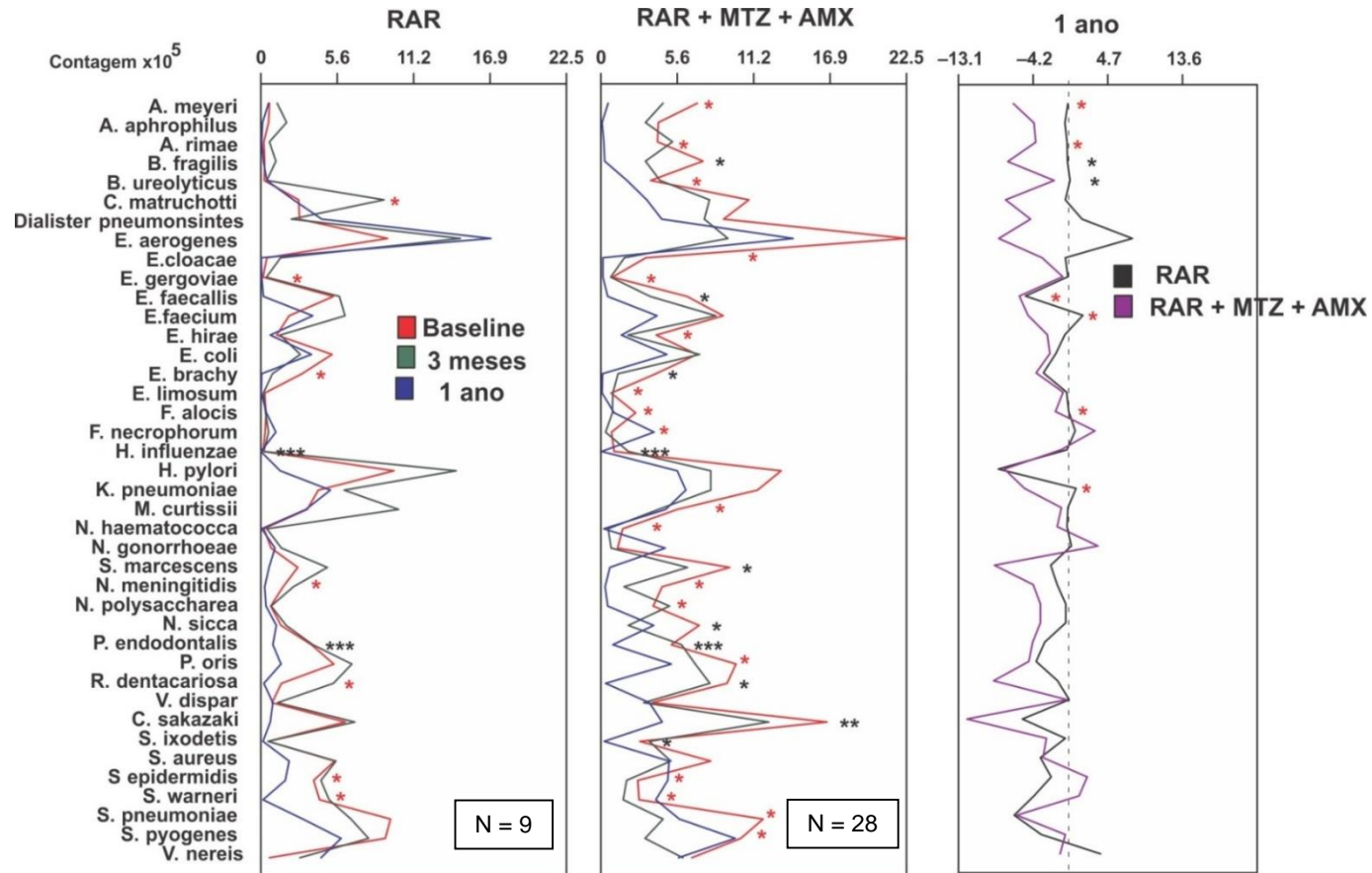
significativas no percentual de sítios colonizados pelas três espécies do complexo vermelho: *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola*. No entanto, o grupo que recebeu antibióticos sistêmicos, apresentou reduções significativas em nove espécies do complexo laranja (*Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *E. nodatum*, *Fusobacterium nucleatum ssp nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum ssp polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum ssp vincentii*, *Fusobacterium periodonticum* e *P. intermedia*) contra três no grupo controle (*E. nodatum*, *Parvimonas micra* e *P. nigrescens*) (Figura 11).

Em relação aos níveis (Figura 12), todas as espécies do complexo vermelho também sofreram reduções estatisticamente significativas independentemente da terapia utilizada. Porém, no complexo laranja, quatro espécies sofreram redução no grupo teste (*E. nodatum*, *F. nucleatum ssp nucleatum*, *F. nucleatum ssp polymorphum* e *F. nucleatum ssp vincentii*) e três tiveram os níveis reduzidos no grupo controle (*E. nodatum*, *F. nucleatum ssp nucleatum* e *P. micra*).

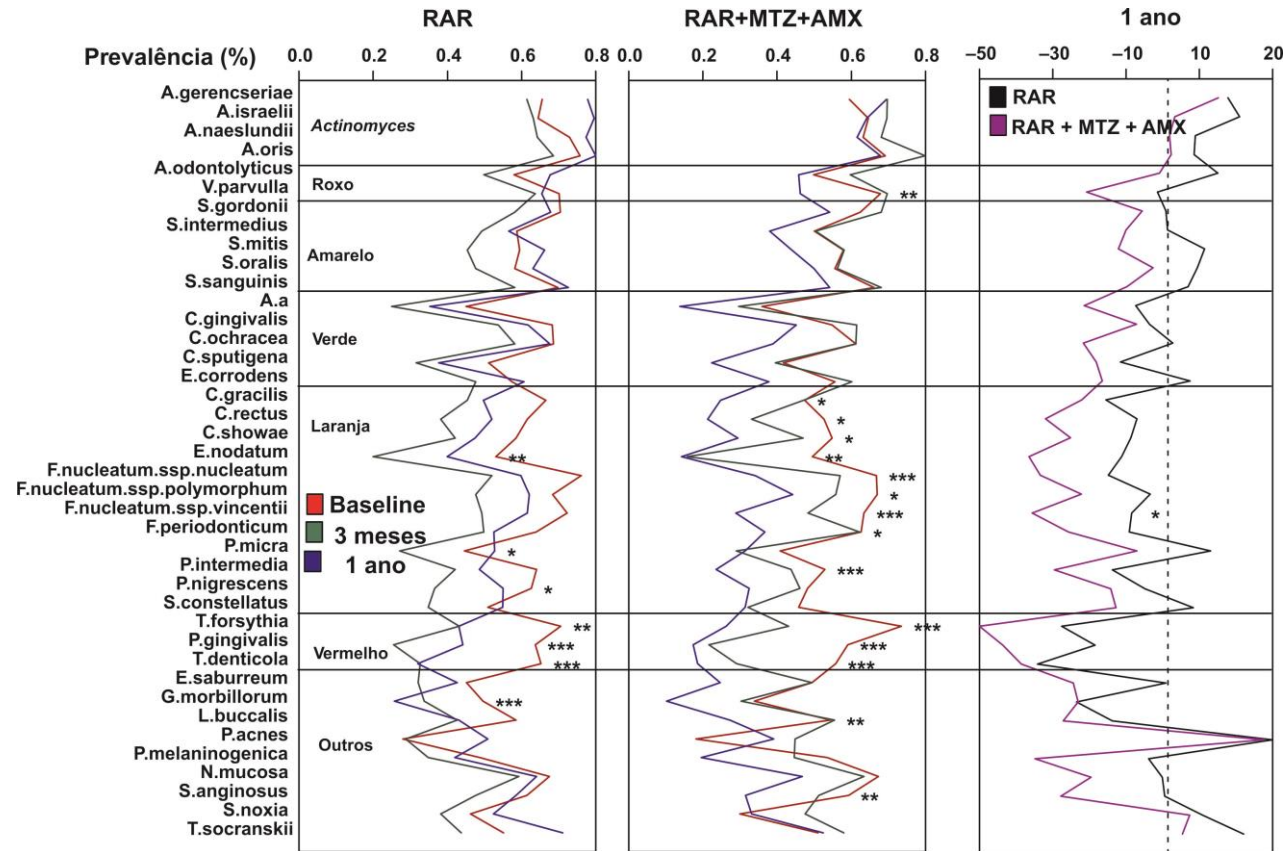
A Figura 13 (Página 56) mostra as alterações ocorridas nas proporções dos diferentes complexos microbianos (Socransky et al. 1998) nos dois grupos no início do estudo e em 1 ano. Não houve diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos complexos avaliados no início do estudo. Em 1 ano as duas terapias levaram a uma redução significativa nas proporções dos complexos vermelho e laranja, passando de 26% e 30% respectivamente para 9% e 20% no grupo da RAR, e de 26% e 28% respectivamente para 3% e 18% no grupo da RAR+MTZ+AMX e um aumento nas proporções de *Actinomyces* que passou de 11% para 26% no grupo da RAR e de 9% para 36% no grupo das terapias combinadas. Na comparação entre os dois grupos em 1 ano, o grupo tratado com antibióticos sistêmicos mostrou proporções estatisticamente menores de complexo vermelho (3%) e maiores de *Actinomyces* (36%) do que o grupo tratado com RAR somente, aonde essas espécies representavam respectivamente, 9% e 26% das 40 avaliadas.



**Figura 9:** Média do percentual de sítios periodontais colonizados (prevalência) pelas novas espécies bacterianas avaliadas nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo, 3 meses e 1 ano pós-terapias, e comparação entre os grupos para alterações ocorridas entre o início do estudo e 1 ano pós-terapias. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney; e dentro de cada grupo, nos diferentes tempos, pelo teste Friedman ( $p < 0.05$ ). RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina. (\*) indica significância estatística ajustada para comparações múltiplas; (N) indica significância estatística não ajustada; (N) indica o número de espécies bacterianas que foram reduzidas em prevalência para cada grupo terapêutico

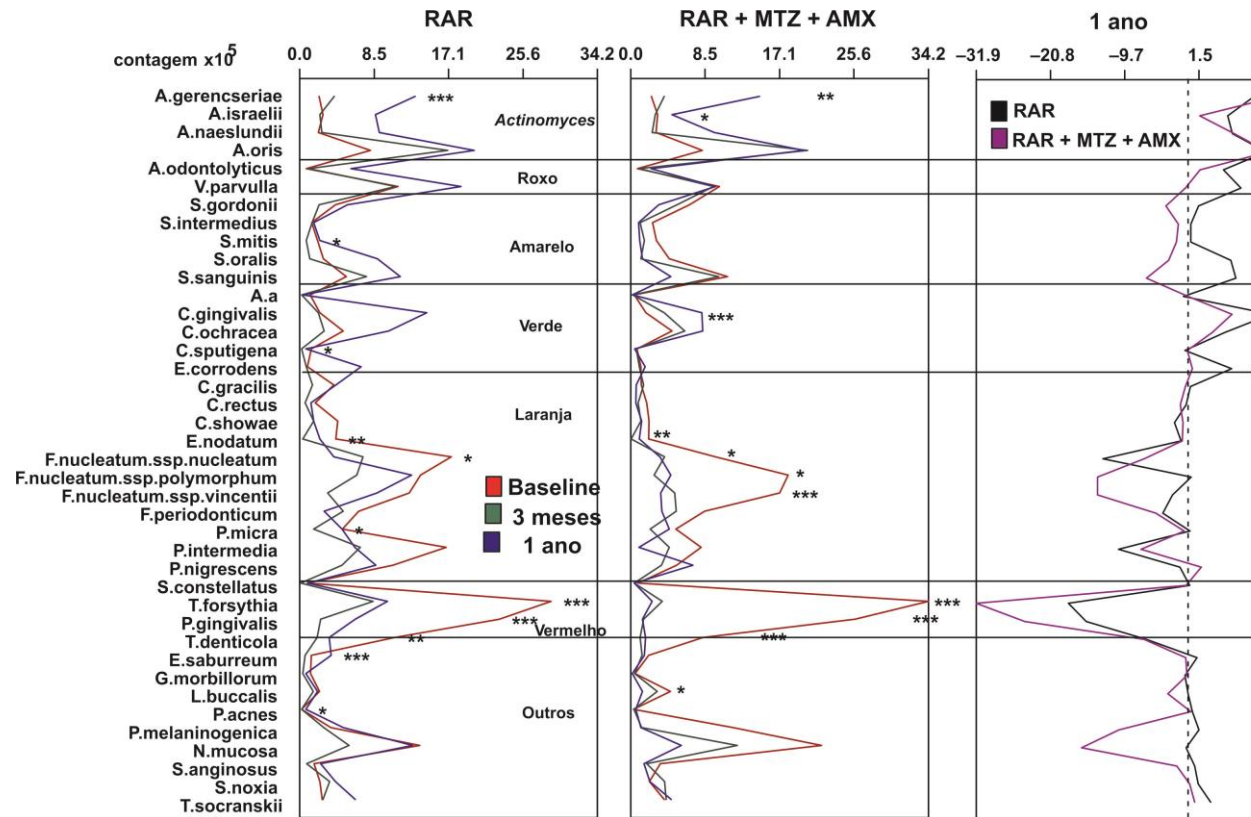


**Figura 10:** Média da contagem ( $\times 10^5$ ) das novas espécies bacterianas avaliadas nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo, 3 meses e 1 ano pós-terapias, e comparação entre os grupos para alterações ocorridas entre o início do estudo e 1 ano pós-terapias. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney; e dentro de cada grupo, nos diferentes tempos, pelo teste Friedman ( $p < 0.05$ ). RAR, terapia de raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina. (\*) indica significância estatística ajustada para comparações múltiplas; (\*) indica significância estatística não ajustada; (N) indica o número de espécies bacterianas que foram reduzidas em contagem para cada grupo terapêutico

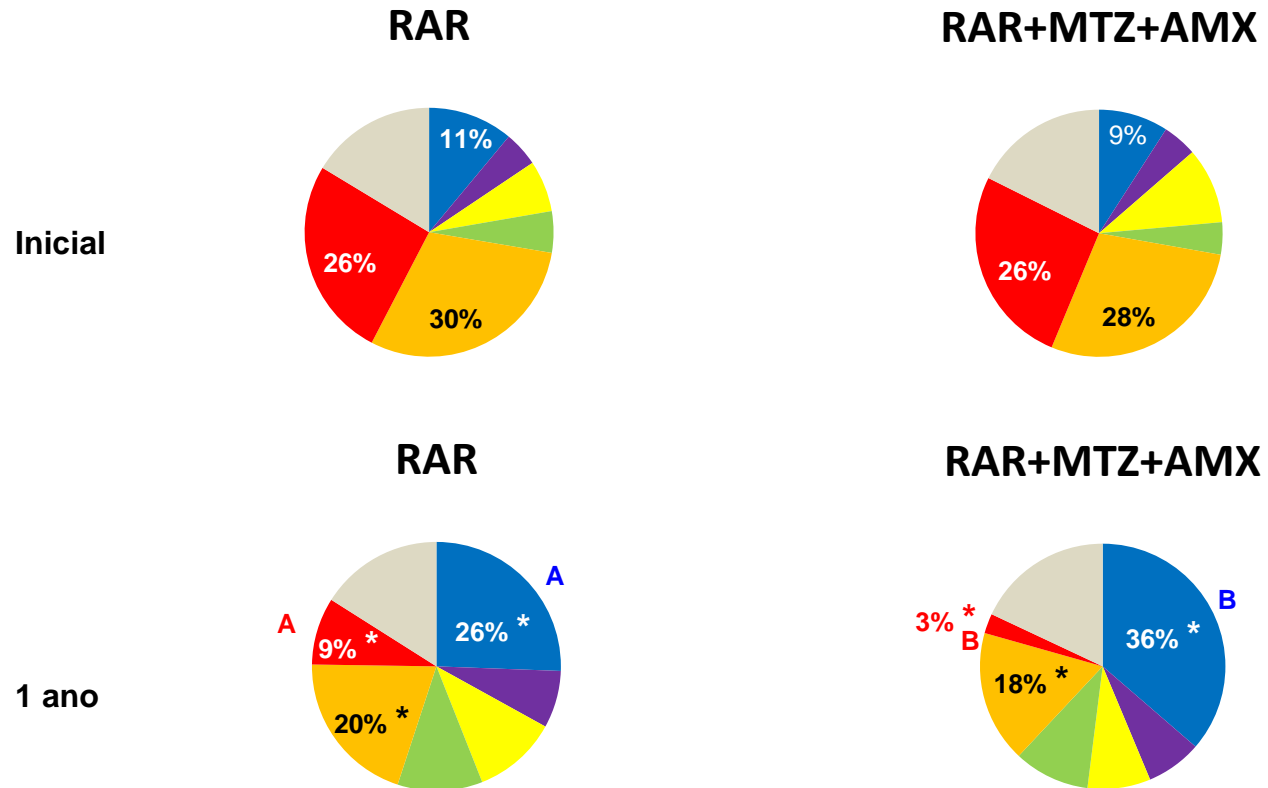


**Figura 11:** Média do percentual de sítios periodontais colonizados (prevalência) pelas espécies bacterianas do painel tradicional do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo, 3 meses e 1 ano pós-terapias, e comparação entre os grupos para alterações ocorridas entre o início do estudo e 1 ano pós-terapias. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney; e dentro de cada grupo, nos diferentes tempos, pelo teste Friedman ( $p < 0.05$ ). RAR, terapia de raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina. (\*) indica significância estatística ajustada para comparações múltiplas. As espécies estão agrupadas de acordo com os complexos bacterianos descritos por Socransky et al. (1998)





**Figura 12:** Média da contagem ( $\times 10^5$ ) das espécies bacterianas do painel tradicional do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo, 3 meses e 1 ano pós-terapia e comparação entre os grupos para alterações ocorridas entre o início do estudo e 1 ano pós-terapias. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney; e dentro de cada grupo, nos diferentes tempos, pelo teste Friedman ( $p < 0.05$ ). RAR, terapia de raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina. (\*) indica significância estatística ajustada para comparações múltiplas. As espécies estão agrupadas de acordo com os complexos bacterianos descritos por Socransky et al. (1998).



**Figura 13:** Média de proporção dos complexos bacterianos descritos por Socransky et al. (1998) nos grupos de RAR e RAR+MTZ+AMX no início do estudo e 1 ano pos-terapias. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada pelo teste Mann-Whitney; e dentro de cada grupo, entre os dois tempos pelo teste Wilcoxon ( $p < 0.05$ ). (\*) indica significância estatística entre os tempos, dentro de cada grupo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significantes entre os grupos em 1 ano.



Espécies	Estudo Associação				Estudo Eliminação				
	Elevados em doença ( $p < 0.05$ )				Bas -1 ano		Bas - 1 ano		
	Volun	Boca toda		Sítios rasos		% sítios		Níveis	
		Prev	Niv	Prev	Niv	RAR	+Atb	RAR	+Atb
<i>E. limosum</i>	*	*	*	*	*		*		*
<i>F. alocis</i>	*	*	*	*	*		*		*
<i>F. necrophorum</i>	*	*	*	*			*		*
<i>H. influenzae</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>H. pylori</i>		*	*				*		
<i>K. pneumoniae</i>		*	*						
<i>M. curtissii</i>			*			*	*		*
<i>N. haematococca</i>							*		*
<i>N. gonorrhoeae</i>							*		
<i>N. meningitidis</i>		*	*			*	*	*	*
<i>N. polysaccharea</i>		*					*		*
<i>N. sicca</i>		*				*	*		*
<i>P. endodontalis</i>		*	*			*	*	*	*
<i>P. oris</i>							*		*
<i>R. dentacariosa</i>		*	*			*	*	*	*
<i>S. marcescens</i>		*	*	*			*		*
<i>S. ixodetis</i>	*	*	*	*	*	*	*		*
<i>S. aureus</i>	*	*	*	*	*		*		
<i>S. epidermidis</i>		*	*				*	*	*
<i>S. warneri</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>S. pyogenes</i>	*		*				*		*
<i>V. díspar</i>	*	*	*				*		
<i>V. nereis</i>	*	*	*				*		

Significância estatística ajustada para comparações múltiplas (\*); Significância estatística não ajustada(\*); Vol: Voluntários incluídos na pesquisa; Prev: prevalência (%); Niv: níveis/contagem; % sítios: percentual de sítios colonizados; Bas-1 ano: espécies bacterianas reduzidas significativamente entre o início do estudo e 1 ano pós-terapias; RAR: raspagem e alisamento radicular; Atb: terapia de RAR e antibióticos sistêmicos.

A Tabela 8 sintetiza os dados apresentados na Tabela 7 de acordo com os critérios utilizados para a categorização das espécies avaliadas em dois níveis de evidência – Forte e Moderado - para o status de “patógeno periodontal”. Oito espécies foram incluídas na categoria de evidência Forte; foram elas: *A. rimae*, *C. sakazakii*, *E. gergoviae*, *E. faecalis*, *L. limosum*, *F. alocis*, *H. influenzae* e *S.*

*warneri*. Quatro espécies foram incluídas na categoria de evidência Moderada; foram elas: *E. coli*, *F. necrophorum*, *S. ixodetis* e *S. aureus*.

**Tabela 8:** Categorização de “novas” espécies bacterianas incluídas na pesquisa de acordo com o grau de associação com periodontite crônica.

<b>Associação Forte</b>		<b>Associação Moderada</b>	
<b>Espécies</b>	<b>Cepas</b>	<b>Espécies</b>	<b>Cepas</b>
<i>Atopobium rimae</i>	49626	<i>Escherichia coli</i>	10799
<i>Cronobacter sakazakii</i>	12868	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	25286
<i>Enterobacter gergoviae</i>	33028	<i>Spiroplasma ixodetis</i>	33835
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	<i>Staphylococcus aureus</i>	33591
<i>Eubacterium limosum</i>	8486		
<i>Filifactor alocis</i>	35896		
<i>Haemophilus influenzae</i>	33533		
<i>Staphylococcus warneri</i>	27836		

## 5. DISCUSSÃO

Com o propósito de identificar possíveis novos patógenos periodontais, esse trabalho incluiu dois estudos, um de Associação e outro de Eliminação. Esses dois desenhos experimentais são considerados os mais importantes quando se deseja estabelecer uma relação causal entre um microrganismo e uma determinada infecção (Socransky 1979).

Alguns aspectos do desenho experimental merecem destaque. Em relação ao estudo de Associação, a escolha em se avaliar especificamente os níveis e o percentual de sítios rasos colonizados pelas espécies bacterianas avaliadas baseia-se em conceitos ecológicos sobre início e progressão das periodontites. Estudos de Associação anteriores determinaram que espécies hoje consideradas verdadeiros patógenos, como os membros do complexo vermelho, estariam em níveis mais altos em sítios profundos de voluntários com doença periodontal (Socransky et al. 1998). Porém, um contínuo debate na literatura periodontal questiona se esse aumento realmente configuraria uma associação causal entre esses patógenos e a periodontite ou seria decorrente de um supercrescimento dessas espécies, favorecidas pelas condições ambientais da bolsa periodontal, como ausência de oxigênio e grande disponibilidade de nutrientes necessários para o crescimento desses patógenos (ex.: metais, aminoácidos e peptídeos). De certa forma a presença dessas espécies em sítios rasos ( $PS \leq 3$  mm) seria mais um indício da relação causal entre presença do microrganismo e início da infecção.

Em relação às análises estatísticas, é importante destacar que em relação aos dados dos sítios rasos, a maioria das associações foram observadas apenas pelas análises não ajustadas, o que era esperado uma vez que o número de amostras é reduzido a um terço quando somente esses sítios são considerados. Da mesma forma, no estudo de Eliminação, o grupo de periodontite crônica ( $n=40$ ) foi dividido em dois grupos de 20 voluntários, o que também pode reduzir o poder do estudo, podendo dificultar a obtenção de significâncias estatísticas quando ajustes para comparações múltiplas são empregados. Logo, ao realizarmos a categorização das espécies quanto ao nível de evidência para o “status” de patógeno periodontal, julgamos importante considerar os resultados

obtidos nas análises ajustadas e não ajustadas para os dados relativos aos sítios rasos e ao estudo de Eliminação.

Os resultados sugeriram evidência forte ou moderada para a associação de 12 das “novas” espécies bacterianas com a etiologia da periodontite crônica. As espécies que mostraram evidência forte foram: *A. rimae*, *C. sakazakii*, *E. gergoviae*, *E. faecalis*, *E. limosum*, *F. alocis*, *H. influenzae* e *S. warneri*, e as que mostraram evidência moderada foram: *E. coli*, *F. necrophorum*, *S. ixodetis* e *S. aureus*.

Um achado que chama a atenção é o fato de duas das espécies categorizadas como de associação Forte com periodontite: *E. limosum* e *H. influenzae* não terem sido encontradas em nenhum paciente com saúde periodontal. Por outro lado, elas estavam presentes respectivamente em 82,5% e 75% dos voluntários com periodontite (Tabela 5). No entanto, essa informação deve ser avaliada com cautela, pois apesar de presentes na maioria dos voluntários com periodontite, elas estavam em níveis (Figura 5), e proporções (Figura 8) muito baixos nesses indivíduos. Estudos de ecologia revelam que os resultados relativos a níveis e proporções parecem ser mais relevantes do que a simples presença ou ausência dos microrganismos no ambiente subgengival (Socransky e Haffajee 2002, Teles et al. 2006, Haffajee et al. 2006). Seguindo essa linha de pensamento vale destacar que dentre as oito espécies que mostram associação Forte com periodontite crônica, três delas - *C. sakazakii*, *E. faecalis* e *S. warneri* - estavam presentes em níveis mais altos e em um percentual de sítios acima da mediana das “novas” espécies avaliadas, tanto na avaliação de todos os sítios quanto em sítios rasos. Quando a proporção das 80 espécies foram avaliadas (Figura 8) essas 3 espécies foram as únicas, entre as oito de associação Forte, detectadas em proporções acima da mediana. Além disso, elas foram encontradas em níveis e prevalência muito reduzidos no grupo de voluntários com saúde periodontal.

*C. sakazakii* é um bastonete Gram-negativo pertencente a família Enterobacteriaceae que não faz parte da microbiota normal da cavidade oral ou do trato gastrointestinal humano ou animal. É reconhecido como um patógeno oportunista de origem alimentar e já foi relacionada a casos de meningite neonatal (Massod et al. 2013, Hunter et al. 2013). Em periodontia, esse microrganismo já foi encontrado na placa subgengival de indivíduos HIV

positivos com periodontite necrosante (Gaetti-Jardim Júnior, 2008). Porém, de acordo com o estudo de revisão sistemática realizado (Perez-Chaparro et al. submetido), essa espécie não havia ainda sido relacionada com periodontite em pacientes sistemicamente saudáveis. Logo, os dados apresentados no presente estudo em relação à *C. sakazakii* é novo e pode ter desdobramentos clínicos importantes em termos de diagnóstico e tratamento periodontal.

*S. warneri* é um *Staphylococcus* coagulase negativo (CNS) comumente presente na flora epitelial e membranas mucosas humanas. De forma semelhante a outras espécies também CNS, *S. warneri* tem sido avaliado como um possível novo patógeno em infecções não-orais, capaz de causar quadros infecciosos graves, como bacteremia nosocomial (Koksal et al. 2009) Porém, ainda são necessários mais estudos para que a patogenia e a epidemiologia desta espécie fiquem mais claras (Campoccia et al. 2010; Kini et al. 2010). Ao nosso conhecimento essa espécie bacteriana não foi observada em estudos anteriores de Associação em periodontia. Porém, Colombo et al. (1998) detectaram esse microrganismo em amostras de placa subgingival em um grupo de voluntários refratários ao tratamento periodontal convencional. Os autores também detectaram nesse grupo de voluntários outras espécies não comumente encontradas na cavidade oral, incluindo *A. baumannii*, *Gemella haemolysans*, *Pseudomonas aeruginosa*, além de *E. faecalis*, uma espécie fortemente associada com periodontite também no presente estudo. Vale destacar que os únicos estudos de associação que mostraram uma associação de *E. faecalis* com periodontite foram realizados em indivíduos brasileiros (Colombo et al. 1998, Colombo et al. 2002, Souto et al. 2006, Souto & Colombo 2008, da Sila-Boghossian et al. 2011). Isto poderia ser um exemplo de uma especificidade geográfica. No entanto, esta informação precisaria ser confirmada por estudos futuros avaliando a prevalência desta espécie em outras populações. Curiosamente, essa espécie não foi detectada nos estudos de sequenciamento direto ou de clonagem e sequenciamento. *E. faecalis* faz parte da microbiota comensal do trato gastrointestinal humano, mas também atua como patógenos oportunistas quando migra para outros mucosa e pele (Vebo et al, 2009; Vu e Carvalho, 2011). Essa espécie está relacionada a diferentes tipos de infecções, incluindo infecções nosocomiais, já foi catalogado como o terceiro patógeno mais prevalente isolado de bacteremia e é a causa mais frequente de



infecções pós-cirúrgicas em unidades de terapia intensiva (Vebo et al., 2009). Em relação a infecções orais, *E. faecalis* tem sido associado com casos de insucesso de tratamento do canal radicular (Stuart et al. 2006, Wang et al. 2012).

Duas outras espécies que merecem destaque são o *S. aureus* e a *E. coli* que foram classificadas como de evidência Moderada; porém, seguiram o mesmo padrão descrito para *C. sakazaki*, *E. faecallis* e *S. warneri*, ou seja, mostraram-se elevadas nos indivíduos com periodontite em níveis, proporções e percentual de sítios colonizados. Essas espécies também estavam em níveis e prevalência baixas no grupo de saúde periodontal.

*S. aureus* produz uma vasta variedade de toxinas estando relacionado principalmente a infecções respiratórias (Valour et al. 2013). Um das ferramentas utilizadas por essa espécie para aumentar seu potencial patogênico é a produção de toxinas, que altera de forma eficaz as funções específicas de células alvo (Hu et al. 2013). Existem relatos da presença dessa bactéria na cavidade oral desde a década de 70, tendo sido associada principalmente a infecções endodônticas (Wyman et al. 1978). Recentemente, Persson et al. (2011, 2013) sugeriram que essa espécie pode estar associada com a etiologia das periimplantites. Souto et al. (2006) mostraram que *S. aureus* estava elevada em voluntários com periodontite crônica em comparação com um grupo periodontalmente saudável.

*E. coli* é uma bactéria que coloniza normalmente o intestino humano e de alguns animais, mas que em alguns casos pode causar infecções, como infecção urinária e intestinal (Hanan et al. 2008, Hodges & Hecht, 2013). Assim como *E. faecalis*, essa bactéria foi associada à etiologia da periodontite apenas em estudos que avaliaram pacientes Brasileiros (Colombo et al. 2002, Souto et al. 2006). Logo, esse pode ser mais um exemplo de um patógeno periodontal específico da população Brasileira. Haffajee et al. (2004) mostraram diferenças importantes nos perfis microbiológicos de amostras de placa bacteriana de indivíduos com periodontite crônica de 4 diferentes países – Brasil, Estados Unidos, Chile e Suécia. Outros estudos que se seguiram também mostraram diferenças microbiológicas específicas na composição da microbiota periodontal entre diferentes regiões geográficas (van Winkelhoff et al. 2005, Herrera et al. 2008).

O fato de *P. endodontalis* não ter mostrado nenhuma associação com periodontite foi inesperado, pois essa espécie já foi apontada como possível patógeno periodontal em vários estudos anteriores que utilizaram *nested* PCR (Mayanagi et al. 2004), Sanger sequencing (Kumar et al. 2003) ou pirosequenciamento (Griffen et al. 2012, Abusleme et al. 2013). Situação semelhante ocorreu com *D. pneumosintes* que também não mostrou nenhuma associação específica com periodontite crônica no presente estudo, porém já havia sido associado à periodontite crônica por Mayanagi et al. (2004) e Kumar et al. (2005).

Por outro lado, *F. alocis* que foi incluída no presente estudo na categoria de evidência forte, já havia sido sugerida como possível patógeno periodontal em cinco estudos anteriores de periodontite crônica (Kumar et al. 2003, Kumar et al. 2005, Schlfer et al. 2010, Griffen et al. 2012, Abusleme et al. 2013) e um de periodontite agressiva (Schlfer et al. 2010, Fine et al. 2013). Essa espécie também já foi relacionada com processos infecciosos em endodontia (Gomes et al. 2006) e em implantodontia (da Silva et al. 2013)

Os resultados clínicos dos dois tratamentos periodontais utilizados no estudo de Eliminação confirma dados de estudos anteriores que sugerem que os dois tratamentos levam a melhoras nos parâmetros clínicos periodontais, porém, quando o MTZ e a AMX são utilizados em associação à RAR essas melhoras são mais evidentes (Feres et al. 2012, Mestnik et al. 2012, Faveri et al. 2013, Goodson et al. 2012, Sgolastra et al. 2012, Zandbergen et al. 2012). Essa avaliação é importante porque confirma o efeito dessas terapias, principalmente a terapia que incluiu antibióticos sistêmicos, na redução dos níveis e da prevalência das espécies que foram consideradas como possíveis novos patógenos periodontais. Os resultados das 40 espécies bacterianas do painel tradicional do *Checkerboard DNA-DNA hybridization* sustenta os resultados clínicos e confirma o valor dessas espécies como marcadores biológicos para a avaliação da eficácia de diferentes terapias, como demonstrado anteriormente (Carvalho et al. 2004, Carvalho et al. 2005, Mestnik et al. 2010, Socransky et al. 2013) As 12 espécies categorizadas em evidência Forte ou Moderada foram significativamente reduzidas pela terapia de RAR+MTZ+AMX, porém apenas quatro delas, *E. gergoviae*, *H. influenzae*, *S. warneri* e *S. ixodetis*, foram significativamente reduzidas pela RAR somente.

Os resultados desse estudo podem contribuir para o melhor entendimento da etiologia da periodontite crônica e conseqüentemente pode auxiliar em estudos futuros de diagnóstico e intervencionais. As evidências sugerem “novos” patógenos periodontais que devem ser monitorados em estudos de ecologia da cavidade oral e nos estudos que avaliam a eficácia das diversas terapias periodontais.

## 6. CONCLUSÕES

As espécies *A. rimae*, *C. sakazakii*, *E. gergoviae*, *E. faecalis*, *E. limosum*, *F. alocis*, *H. influenzae*, e *S. warneri* foram fortemente associadas à ocorrência de periodontite crônica generalizada, enquanto que as espécies *E. coli*, *F. necrophorum*, *S. ixodetis* e *S. aureus* apresentaram associação moderada com a ocorrência dessa doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abiko Y, Sato T, Mayanagi G, Profiling TN. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. **J Perio Res.** 2010:389–395.

Abusleme L, Dupuy AK, Dutza, N N, Silva N, Burleson J. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. **ISME J.** 2013:1–10.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent J.** 1975:229-35.

Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. **J Periodontol.** 1997; 68: 973 - 981.

Barak S, Barak OO, Machtei EE, Sprecher H, Ohel G. Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of womens with preeclampsia. **J Periodontol** 2007; 78:670-676.

Bonta Y, Zambon JJ, Genco RJ, Neiders ME. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival plaque: comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Dent. Res.** 1985: 64: 793 – 798.

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: 696 - 704.

Campoccia D, Montanaro L, Visai L, Corazzari T, Poggio C, Pegreffo F, Maso A, Pirini V, Ravaioli S, Cangini I, Speziale P, Arciola CR. Characterization of 26

*Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. **Int J Artif Organs.** 2010:575-81.

Carvalho 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: 1070 - 6.

Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Gonçalves C, 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 II--microbiological results. **J Clin Periodontol.** 2005: 406 -11.

Colombo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, Paster BJ, Smith CM, Cugini MA, Socransky SS. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. **J Clin Periodontol.** 1998:169-80.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém WJ, Mendes MC, Uzeda, M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.** 2002:360-9.

Colombo AP V, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. **J. Periodontol.** 2009: 1421–32.

Contreras A, Herrera JA, Soto JE, Arce RM, Jaramillo A, Botero JE. Periodontitis is associated with preeclampsia in pregnant women. **J Periodontol** 2006; 77:182-188.

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

da Silva ES, Feres M, Figueiredo LC, Shibli, JA, Ramiro FS, Faveri M. Microbiological diversity of peri-implantitis biofilm by Sanger sequencing. **Clin Oral Implants Res.** 2013

Dasanayake AP, Boyd D, Madianos PN, Offenbacher S, Hills E. The association between Porphyromonas gingivalis-specific maternal serum IgG and low birth weight. **J Periodontol** 2001; 72:1491-1497.

Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR, Sacco RL, Papapanou PN. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the oral infections and vascular disease epidemiology study. **Circulation** 2005; 111:576-582.

Dogan B, Buduneli E, Emingil G, Atilla G, Akilli A, Antinheimo J, Lakio L, Asikainen S. Characteristics of periodontal microflora in acute myocardial infarction. **J Periodontol** 2005; 76:740-748.

Dzink JL, Socransky SS, Ebersole JL, Frey DE. ELISA and conventional techniques for identification of *black-pigmented Bacteroides* isolated from periodontal pockets. **J Perio Res.** 1983; 18: 369 – 374.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal Biochem.** 1983:6-13.

Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrendiz J, Furgang D, Paster BJ, Dewhirst FE. A consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Filifactor alocis* is present in sites prior to bone loss in a longitudinal study of localized aggressive periodontitis. **J Clin Microbiol.** 2013: 2850-61.

Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2009:36(9):739-49.

Faveri M, Rebello A, de Oliveira Dias R, Borges-Junior I, Mendes Duarte P, Cristina Figueiredo L, Feres M. Clinical and Microbiological Effects of Adjunctive Metronidazole Plus Amoxicillin in the Treatment of Generalized Chronic Periodontitis: Smokers Versus non-Smokers. **J Periodontol.** 2013.

Feres M, Faveri M, Figueiredo LC, Soares GMS, Systemic Antibiotics in the Treatment of Periodontitis. **Periodont.** 2000 (in press)

Feres M, Gursky LC, Faveri M, Tsuzuki CO, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. **J Clin Periodontol.** 2009:857-67.

Feres M, Soares GMS, Mendes JAV, Silva MP, Faveri M, Teles R, Socransky SS, Figueiredo LC. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. **J Clin Periodontol.** 2012

Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, Podar M, Leys EJ. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. **ISME J.** 2012; 6: 176-85

Gaetti-Jardim Júnior E, Nakano V, Wahasugui TC, Cabral FC, Gamba R, Avila-Campos MJ. Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of HIV-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. **Braz J Microbiol.** 2008; 257-61.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. **J Endod.** 2006:937-40.



Gonçalves LFH, Fermiano D, Feres M, Figueiredo LC, Teles FRP, Mayer MP a, et al. Levels of *Selenomonas species* in generalized aggressive periodontitis. **J Periodontal Res.** 2012: 47:711–8.

Goodson JM, Haffajee AD, Socransky SS, Kent R, Teles R, Hasturk H, Bogren A, Van Dyke T, Wennstrom J, Lindhe J. Control of periodontal infections: A randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. **J Clin Periodontol.** 2012: 525-36.

Haas AN, Silva-Boghossian CM, Colombo AP, Susin C, Albandar JM, Oppermann RV, Rösing CK.. Adjunctive azithromycin in the treatment of aggressive periodontitis: microbiological findings of a 12-month randomized clinical trial. **J Dent.** 2012: 556-63.

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: 324-34.

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. **J Clin Periodontol** 2004: 996–1002.

Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. **Periodontol 2000.** 2006: 219-58.

Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. **Oral Microbiol Immunol.** 2008:148-57.

Hannan TJ, Mysorekar IU, Chen SL, Walker JN, Jones JM, Pinkner JS, Hultgren SJ, Seed PC. LeuX tRNA-dependent and -independent mechanisms of *Escherichia coli* pathogenesis in acute cystitis. **Mol Microbiol.** 2008:116-28.

Hasegawa K, Furuichi Y, Shimotsu A, Nakamura M, Yoshinaga M, Kamitomo M, Hatae M, Maruyama I, Izumi Y. Associations between systemic status, periodontal status, serum cytokine levels, and delivery outcomes in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. **J Periodontol** 2003; 74:1764-1770.

Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. **J Clin Periodontol**. 2008:106-13.

Hodges K, Hecht G. Bacterial infections of the small intestine. **Curr Opin Gastroenterol**. 2013:159-63.

Hu DL, Nakane A. Mechanisms of *staphylococcal* enterotoxin-induced emesis. **Eur J Pharmacol**. 2013: 764-4.

Hunter CJ, Bean JF. *Cronobacter*: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis. **J Perinatol**. 2013:581-5.

Kini GD, Patel K, Parris AR, Tang JS. An Unusual Presentation of Endocarditis Caused by *Staphylococcus warneri*. **Open Microbiol J**. 2010:103-5.

Koksal F, Yasar H, Samasti M. Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative *staphylococcus strains* isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. **Microbiol Res**. 2009: 404-10.

Koch R. Die Aetiologie der Tuberculose. **Berliner klin. Wochenschr**. 1882: 221–230

Kumar PS, Griffen a. L, Barton J a., Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ New Bacterial Species Associated with Chronic Periodontitis. **J. Dent. Res.** 2003: 338–344.

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of Candidate Periodontal Pathogens and Beneficial Species by Quantitative 16S Clonal Analysis. **J Clin Microbiol.** 2005: 3944–3955.

Lalla E, Kaplan S, Chang SJ, Roth GA, Celenti R, Hinckley K, Greenberg E, Pappapanou PN. Periodontal infection profiles in type 1 diabetes. **J Clin Periodontal** 2006; 33:855-862.

Lang NP, Tonetti MS. Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). **Oral Health Prev Dent.** 2003: 7-16.

Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. **J Clin Periodontol.** 1995: 885-90.

Lin D, Moss K, Beck JD, Hefti A, Offenbacher S. Persistently high levels of periodontal pathogens associated with preterm pregnancy outcome. **J Periodontal** 2007; 78:833-841.

Liu B, Faller LL, Klitgord N, Mazumdar V, Ghodsi M, Sommer DD, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. **PLoS One** 2012: 379-19.

Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H, Takahashi N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. **Oral Microbiol. Immunol.** 2004: 379–85.

Masood N, Moore K, Farbos A, Hariri S, Block C, Paszkiewicz K, Dickins B, McNally A, Forsythe S. Draft Genome Sequence of a Meningitic Isolate of *Cronobacter sakazakii* Clonal Complex 4, Strain 8399. **Genome Announc.** 2013.

Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. **J Clin Periodontol.** 2008: 885-96.

Mateu, F. A.; Boneta, A. E.; de Vizio, W.; Stewart, B.; Proskin, H. M. clinical investigation of the efficacy of two dentifrices for controlling established supragingival plaque and gingivitis. **Journal of Clinical Dentistry.** 2008: 85–94.

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Duarte PM, Lira EA, Faveri M. Short-term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicillin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2010

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Soares G, Teles RP, Fermiano D, Duarte PM, Faveri M. The effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical Trial. **J Clin Periodontol.** 2012: 955-61.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. **J Bacteriol.** 2001:3770-83.

Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão Veras E, Tamashiro N, Duarte PM, Feres M . Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. **J Dent. Res.** submetido

Persson GR, Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert S. Microbiologic results after non-surgical erbium-doped:yttrium, aluminum, and garnet laser or air-abrasive treatment of peri-implantitis: a randomized clinical trial. **J Periodontol.** 2011:1267-78.

Persson GR, Renvert S. Cluster of Bacteria Associated with Peri-Implantitis. **Clin Implant Dent Relat Res.** 2013.

Sampaio E, Rocha M, Figueiredo LC, Faveri M, Duarte PM, Gomes Lira EA, Feres M. Clinical and microbiological effects of azithromycin in the treatment of generalized chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol.** 2011:838-46

Sgolastra F, Gatto R, Petrucci A, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol.** 2012: 1257-69.

Sims TJ, Lernmark A, Mancl LA, Schifferle RE, Page RC, Persson GR. Serum IgG to heat shock proteins and Porphyromonas gingivalis antigens in diabetic patients with periodontitis. **J Clin Periodontol** 2002; 29:551-562.

Soares GMS, Mendes JAV, Silva MP, Faveri M, Teles R, Socransky Ss, Wang X, Figueiredo Lc, Feres M. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to nonsurgical treatment of Chronic Periodontitis: secondary analyses of microbiological results from a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. **J Clin Periodontol** (in press)

Souto R, Colombo AP. Prevalence of Enterococcus faecalis in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. **Arch Oral Biol.** 2008; 53(2):155-60.

Socransky SS. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1979; 6:16–21.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sample sites. **J Clin Periodontol.** 1991; 18: 766–75.

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

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

Socransky SS & Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000.** 2002: 2-55.

Socransky SS, Haffajee AD, Teles R, Wennstrom JL, Lindhe J, Bogren A, Hasturk H, van Dyke T, Wang X, Goodson JM. Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota over a 2-year monitoring period. I. Overall effect and kinetics of change. **J Clin Periodontol.** 2013:771-80.

Souto R, Colombo APV. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. **Arch. Oral Biol.** 2008: 155–60.

Schlafer S, Riep B, Griffen AL, Petrich A, Hübner J, Berning M. *Filifactor alocis* involvement in periodontal biofilms. **BMC Microbiol.** 2010: 10-66.

Stuart CH, Schwartz S a, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J. Endod.** 2006: 93–8.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. **Periodontology 2000.** 2006: 180-218.

Teles FRF, Teles RP, Siegelin Y, Paster B, Haffajee a D, Socransky SS. RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) for the enumeration of uncultivated bacterial species in subgingival biofilms. **Oral Microbiol.** 2011:127–39.

Valour F, Chebib N, Gillet Y, Reix P, Laurent F, Chidiac C, Ferry T. *Staphylococcus aureus* broncho-pulmonary infections. **Rev Pneumol Clin.** 2013.

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: 893-8.

Vebø HC, Snipen L, Nes IF, Brede D. The transcriptome of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583 reveals adaptive responses to growth in blood. **PLoS One.** 2009.

Vu J, Carvalho J. *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. **Front. Biol.** 2011:357–366.

Wang Q-Q, Zhang C-F, Chu C-H, Zhu X-F. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. **J. Oral Sci.** 2012:19–23.

Wyman TP, Dowden WE, Langeland K. *Staphylococcus aureus* isolation from a clinically nonexposed root canal. **J Endod.** 1978:122-8.

Zandbergen D, Slot DE, Cobb CM, Van der Weijden FA. The Clinical Effect of Scaling and Root Planing and The Concomitant Administration of Systemic Amoxicillin and Metronidazole: A Systematic Review. **J Periodontol.** 2012.

Zappa U, Reinking-Zappa M, Graf H, Gmür R, Savitt E. Comparison of serological and DNA probe analyses for detection of suspected periodontal pathogens in subgingival plaque samples. **Arch Oral Biol.** 1990: 161-4.