



DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

ELVIS FERNANDES COELHO

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PERFIS DE SIMILARIDADE DA
MICROBIOTA SUBGENGIVAL NA RESPOSTA A DUAS TERAPIAS
PERIODONTAIS – RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULARES
ASSOCIADOS OU NÃO A ANTIBIÓTICOS**

**Guarulhos
2015**

ELVIS FERNANDES COELHO

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PERFIS DE SIMILARIDADE DA
MICROBIOTA SUBGENGIVAL NA RESPOSTA A DUAS TERAPIAS
PERIODONTAIS – RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULARES
ASSOCIADOS OU NÃO A ANTIBIÓTICOS**

Tese apresentada à Universidade Guarulhos para
obtenção do título de
Doutor em Odontologia
Área de concentração: Periodontia.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciene C. de Figueiredo

**Guarulhos
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

C672i

Coelho, Elvis Fernandes

Influência de diferentes perfis de similaridade da microbiota subgengival na resposta a duas terapias periodontais – raspagem e alisamento radiculares associados ou não a antibióticos / Elvis Fernandes Coelho. -- 2015.

59 f.; 31 cm.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo

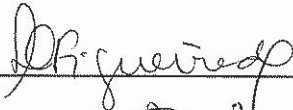
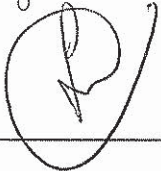
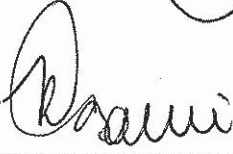
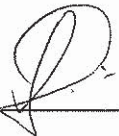
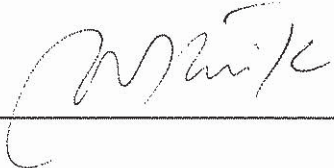
Tese (Doutorado em Odontologia) – Centro de Pós Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2015.

1. Raspagem subgengival 2. Doenças periodontais I. 3. Microbiota
Título II. Figueiredo, Luciene Cristina de, (Orientadora). III. Universidade Guarulhos.

CDD. 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PERFIS DE SIMILARIDADE DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL NA RESPOSTA A DUAS TERAPIAS PERIODONTAIS – RASPAGEM E ALISAMENTO RADICULARES ASSOCIADOS OU NÃO A ANTIBIÓTICOS" em sessão pública realizada em 27 de Março de 2015 considerou o candidato Elvis Fernandes Coelho aprovado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo (UnG) 
2. Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro (UNIP) 
3. Prof. Dr. Renato Correa Viana Casarin (UNIP) 
4. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (UnG) 
5. Profa. Dra. Maria Josefa Mestnik (UnG) 

Guarulhos, 27 de Março de 2015.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Guarulhos, que com seu competente quadro de docentes e funcionários, viabilizou meu crescimento profissional e científico.

Dedico este trabalho aos meus pais Erodice e Cleuza que desde a mais tenra idade me ensinaram valores fundamentais para a convivência em sociedade, e principalmente porque me ensinaram a sonhar.

Dedico também a minha esposa Suélen, que sempre me apoiou nas minhas decisões, aos meus filhos: Isabella, Carlos Augusto, Géssica e Guilherme, assim como aos meus queridos irmãos Hilbernon, Carlos e Paulo.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Luciene Figueiredo pela exemplar capacidade pedagógica e relacional, que muito contribuíram para a construção do meu conhecimento e consequentemente deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UnG, Magda Feres, Marcelo de Faveri, Jamil Awad Shibli, José Augusto Rodrigues, Leandro Chambrone, Marta Ferreira Bastos, Poliana M. Duarte pelos ensinamentos transmitidos, incentivo à pesquisa e exemplos de profissionalismo.

Às funcionárias, Cristina, Izilvania Barreto e Samanta pelos bons serviços prestados quando solicitadas por mim.

Aos demais professores da pós-graduação e funcionários que de alguma maneira contribuíram para minha formação durante o transcurso do doutorado.

Aos meus colegas Antônio Carlos, Neila, Vanessa e Rafael que participaram comigo desse grande desafio.

Aos pacientes que voluntariamente contribuíram com uma parcela bastante significativa para o meu aprendizado, crescimento profissional e também, para a construção deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão desta pesquisa.

DEDICATÓRIA

A Deus, supremo criador dos céus e da terra, Senhor dos Senhores, Deus forte, pai da eternidade e príncipe da paz.

Aquele que sempre será o meu socorro bem presente na hora da angústia. O meu salvador, meu libertador, meu advogado, em quem confio inteiramente.

A ti Senhor dedico toda minha vida e meu sucesso, pois só tu tens palavras de vida eterna.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, mesmo assim estarias comigo, meu amado, meu querido, o mais admirado entre todos.

Aquele que é perfeito, santo, imaculado, o mais desejável de todas as nações.

A ti toda honra, toda glória, todo o louvor, pois tu és o alfa e o ômega, o princípio e o fim, pois sem ti nada do que é seria.

Os céus declaram a glória de Deus, o firmamento proclama a obra de suas mãos.

Um dia faz declaração a outro dia, e uma noite mostra sabedoria à outra noite.

Sem linguagem, sem fala, ouvem-se as suas vozes.

Em toda extensão da terra estende-se a sua voz, e as suas palavras até o fim do mundo (SALMOS,19).

“Que nunca te falte um sonho pelo qual lutar, um projeto para realizar, algo para aprender, um lugar para onde ir, e alguém a quem amar.”

(Vanessa Pimentel)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a influência de diferentes perfis de similaridade da microbiota subgengival na resposta a duas terapias periodontais- raspagem e alisamento radiculares associados ou não a antibióticos (metronidazol ou metronidazol + amoxicilina). Trezentos indivíduos com periodontite, participantes de diferentes estudos clínicos conduzidos pelo grupo de pesquisa em Periodontia do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Guarulhos (UnG) foram incluídos nesta investigação. Os parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração) foram avaliados em seis sítios por dente no início do estudo e 90 dias pós-terapia. Nove amostras de biofilme subgengival foram coletadas por indivíduo, de acordo com as seguintes categorias de profundidade de sondagem inicial: rasas (≤ 3 mm), intermediários (4-6mm) e profundos (≥ 7 mm). As amostras foram avaliadas quanto as proporções de 40 espécies bacterianas subgengivais pela técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*. Um dendograma foi construído de acordo com os dados microbiológicos, e seis *clusters* foram definidos considerando um perfil de similaridade de 67%. As maiores proporções do complexo vermelho foram observadas nos grupos VI (49,3%) e V (31,9%), seguidos dos grupos I (21,9%), IV (20,5%), II (17,3%), e III (9,9%). Por outro lado, o complexo azul representou 23,4% no grupo I; e o complexo amarelo representou 18,3% no grupo II. Nos dois grupos terapêuticos não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os *clusters* em relação ao número de sítios periodontais residuais. Em conclusão, existem diferenças no perfil de similaridade da microbiota subgengival de indivíduos com diagnóstico clínico de periodontite. O perfil de similaridade não influenciou a resposta das duas terapias empregadas.

Palavras-chave: Doença periodontal; Microbiota subgengival; Sondas de DNA.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the influence of different profile of similarity of the subgingival microbiota in response to both periodontal therapies: scaling and root planning with or without antibiotics (metronidazole or metronidazole+amoxicillin). Three hundred periodontal subjects who participated of different clinical trials conducted by the research group in Periodontics at Guarulhos University were included in this investigation. The clinical parameters (probing depth, clinical attachment level, visible plaque, gingival bleeding, bleeding on probing and suppuration) were evaluated at 6 sites per tooth at baseline and 90 days post-therapy. Nine subgingival biofilm samples were collected per subject, 3 samples in each of the following initial probing depth categories: shallow (≤ 3 mm), moderate (4-6 mm) and deep (≥ 7 mm). The samples were evaluated for the proportion of 40 bacterial subgingival species using checkerboard DNA-DNA hybridization. A dendrogram was constructed according to the microbiological data, and six clusters were formed with 67% similarity. The more elevated ratios of the red complex had been observed in clusters VI (49.3%) and V (31.9%), followed of the cluster I (21.9%), IV (20.5%), II (17.3%) and III (9.9%). On the other hand, the blue complex represented 23.4% in cluster I; and the yellow complex represented 18.3% in cluster II. In both therapeutic groups there were no statistically significant differences among the six clusters in relation to average number of periodontal residual sites. There are differences in the profile of similarity of subgingival microbiota of the individuals with clinical diagnosis of periodontitis. The profile of similarity did not influence the response of the both prescribed therapies.

Keywords: Periodontal disease; Subgingival microbiota; DNA probe.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação gráfica do *Minislot* (Immunelectrics, Cambridge, MA, USA) e resumo da preparação e deposição das amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*)..... 30
- Figura 2.** Representação gráfica do *Miniblotter* (Immunelectrics, Cambridge, MA, USA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*) 32
- Figura 3.** Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*) 33
- Figura 4.** Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*). 33
- Figura 5.** Proporção de 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos sete grupos experimentais..... 39
- Figura 6.** Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival nos sete grupos experimentais..... 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação das cepas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos..... 31
- Tabela 2.** Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival..... 34
- Tabela 3.** Média (\pm DP) dos parâmetros demográficos e clínicos de indivíduos com periodontite tratados com raspagem e alisamento radicular, nos sete grupos experimentais..... 41
- Tabela 4.** Média (\pm DP) dos parâmetros demográficos e clínicos de indivíduos com periodontite tratados com raspagem e alisamento radicular associada ao uso de antibióticos (metronidazol ou metronidazol+amoxicilina), nos sete grupos experimentais..... 42
- Tabela 5.** Redução na média do número de sítios residuais com profundidade de sondagem >5 mm nos sete grupos experimentais, para os dois grupos terapêuticos que receberam apenas raspagem e alisamento radicular ou raspagem e alisamento radicular associada ao uso de antibióticos (metronidazol ou metronidazol+amoxicilina) 43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Etiologia da doença periodontal	13
1.1.1	Outros possíveis patógenos	15
1.2	Antibióticos no tratamento da doença periodontal	16
1.2.1	Metronidazol combinado à amoxicilina	17
2	PROPOSIÇÃO	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Seleção da amostra	25
3.2	Crítérios de inclusão e exclusão	25
3.3	Delineamento experimental	26
3.4	Avaliação clínico-periodontal	26
3.5	Avaliação microbiológica	27
3.5.1	Seleção dos sítios-teste	27
3.5.2	<i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	28
3.6	Perfil de similaridade	34
3.7	Procedimentos terapêuticos	35
3.7.1	Terapia periodontal básica	35
3.7.2	Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos e placebos	35
3.8	Análise estatística	36
3.8.1	Avaliação clínica	36
3.8.2	Avaliação microbiológica	36
4	RESULTADOS	37
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é caracterizada como uma doença infecciosa que tem como fator etiológico microrganismos específicos presentes no biofilme bucal, que acometem as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, levando à perda de inserção, de tecido ósseo e eventualmente do elemento dentário (Socransky et al., 1998; AAP, 1999; Socransky; Haffajee, 2005). A forma mais comum da doença periodontal é a crônica e apesar de sua etiopatogenia ser conhecida e bem estudada, ainda não existe um padrão ideal de terapia para todos os pacientes.

O ponto de partida para se definir uma terapia, seja em odontologia ou nas diversas áreas da medicina, é a compreensão da etiologia e progressão das diferentes enfermidades. Neste contexto, vale ressaltar que as doenças periodontais são um grupo de infecções que possuem como fator etiológico primário as bactérias presentes na cavidade oral, especialmente as que colonizam as superfícies dos dentes, supra e subgingivalmente. Muitos avanços, ocorridos principalmente nas duas últimas décadas, facilitaram o entendimento da etiopatogenia das periodontites, incluindo a microbiota patogênica relacionada a cada tipo de doença e o perfil do hospedeiro. Esses conhecimentos têm facilitado o direcionamento de terapias mais específicas para cada paciente.

Em termos da microbiota, já está bem estabelecido na literatura que a gengivite é decorrente do acúmulo indiferenciado de bactérias na margem gengival, enquanto que a destruição periodontal se relaciona não somente à quantidade de biofilme, mas, principalmente, a sua composição (Haffajee; Socransky, 2006). Vários estudos demonstraram que certos microrganismos ou grupos de microrganismos se relacionam com o início e a progressão da perda de inserção periodontal, enquanto que outras espécies, consideradas compatíveis com o hospedeiro, estão mais associadas com saúde periodontal (Teles et al., 2006).

Até o momento ainda não é decisivo porque alguns pacientes, sistemicamente saudáveis, com quadros clínicos semelhantes respondem de maneira mais limitada às terapias periodontais do que outros. Dessa forma, o estudo detalhado da composição do biofilme subgingival em indivíduos com doença periodontal crônica poderá contribuir para o maior entendimento da importância da microbiota na escolha terapêutica.

1.1 Etiologia da doença periodontal

Certos microrganismos presentes nos biofilmes orais têm sido relacionados com o início e a progressão da periodontite (Socransky; Haffajee, 2005). Porém, a simples presença dessas bactérias na cavidade bucal não determina que o indivíduo desenvolva a doença. O equilíbrio entre o hospedeiro e a microbiota bucal na maioria das vezes é benigna e não oferece riscos para as estruturas de suporte dos dentes. Ocasionalmente, um grupo de bactérias pode proliferar ou exibir novas propriedades que levem à destruição do periodonto. Pode-se assim considerar que a doença periodontal se desenvolve a partir de um desequilíbrio na interação entre o hospedeiro e os microrganismos (Socransky; Haffajee, 2005). O percentual de sítios colonizados por esses patógenos e a capacidade do organismo em combater os microrganismos agressores são condições fundamentais para o aparecimento de sinais clínicos da doença periodontal. O clássico estudo de “gingivite experimental” (Løe et al. 1965) mostrou que o acúmulo de placa bacteriana na ausência de higiene oral, em indivíduos saudáveis, por um período de 21 dias, leva impreterivelmente à instalação de um processo inflamatório gengival. Este mesmo estudo demonstrou que a remoção da placa e a instituição de hábitos de higiene bucal são capazes de reverter o processo inflamatório.

Naquela época, acreditava-se que a doença periodontal era oriunda de um supercrescimento da placa bacteriana, de forma que qualquer microrganismo presente no ambiente subgengival poderia contribuir ativamente para a destruição dos tecidos; e este conceito ficou conhecido como “Hipótese da Placa Não Específica” (Lovdal et al., 1958; Schei et al., 1959; Løe et al., 1965; Theilade et al., 1966; Løe et al., 1967; Russel, 1967). Todavia, investigações epidemiológicas realizadas na década de 80 vieram a contradizer esta hipótese (Løe et al., 1986; Baelum et al., 1988). Nestes estudos foram observados indivíduos que, mesmo com uma quantidade considerável de placa bacteriana, não desenvolviam doença periodontal, enquanto outros indivíduos com quantidades reduzidas de placa apresentavam uma rápida destruição tecidual. Retomou-se, então, o conceito da especificidade microbiana da doença periodontal, que ficou conhecido como “Hipótese da Placa Específica” (Loesche, 1976). Esta hipótese é aceita até os dias atuais e sugere que a placa bacteriana subgengival presente em lesões de

periodontite é qualitativa e quantitativamente diferente da placa presente em sítios saudáveis (Rosenberg et al., 1981; Hinrichs et al., 1985; Dzink et al., 1988; Adriaens et al., 1988; Albandar et al., 1990; Christersson et al., 1992; Loesche, 1992) e que diferentes formas da doença estão associadas às diferentes espécies bacterianas ou grupos de bactérias (Loesche et al. 1985; Marsh, 1992; Haffajee; Socransky, 1994; Socransky et al., 1998). Sabe-se hoje que apesar de mais de 600 espécies bacterianas terem sido isoladas e identificadas na cavidade bucal (Slots, 1977; Moore et al., 1987; Loesche; Kazor, 2002), nem todas possuem papel determinante na etiologia da doença periodontal.

O desenvolvimento, na década de 90, de técnicas imunológicas e de biologia molecular para a detecção dos microrganismos que compõem os biofilmes orais foi importante para uma descrição mais precisa das espécies bacterianas subgingivais relacionadas a diferentes formas de periodontite (Christersson et al., 1987; Àvila-Campos et al., 1999; Socransky et al., 1994; Gomes et al., 2006). A grande vantagem dessas técnicas é a possibilidade de detecção de microrganismos fastidiosos como a *Tannerella forsythia* e as espiroquetas, espécies difíceis de serem detectadas pelos métodos tradicionais de diagnóstico, como a cultura bacteriana.

Socransky et al. (1994) descreveram a técnica de diagnóstico microbiológico do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* que utiliza sondas de DNA para o diagnóstico microbiológico, e analisaram as associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgingival de indivíduos com periodontite crônica (Socransky et al., 1998). Os autores observaram a presença de cinco complexos bacterianos principais neste ambiente subgingival, de acordo com a relação entre as diferentes espécies. Um dos complexos, composto pelas espécies *T. forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, chamado de complexo vermelho, foi fortemente relacionado com profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem. Outro complexo, o laranja, que parece preceder a colonização do complexo vermelho foi dividido em dois grupos, um central, composto por *Fusobacterium nucleatum* (*Fusobacterium nucleatum* ss. *nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* ss. *polymorphum*, *Fusobacterium nucleatum* ss. *vincentii*), *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*; e outro grupo periférico, formado por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* e

Streptococcus constellatus. Os outros três complexos, o amarelo, o verde e o roxo, demonstraram grande associação entre si e menor associação com os dois primeiros, e são compostos por diversas espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro. O complexo verde é formado por *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a; o complexo amarelo é composto por um grupo de estreptococos: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*; e o complexo roxo inclui *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*. As espécies de *Selenomonas noxia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo b não se correlacionaram com outras espécies. Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* genoespécies I e II) foram agrupadas no complexo azul (Socransky; Haffajee, 2002).

1.1.1 Outros possíveis patógenos

Alguns estudos em microbiologia oral, realizados na última década, têm proporcionado evidências adicionais do papel de outros patógenos na etiologia da doença periodontal e, assim, novos candidatos estão sendo sugeridos. Neste contexto, o foco dos pesquisadores está voltado para outros microrganismos diferentes daqueles usualmente considerados periodontopatógenos (*A.actinomycetemcomitans*, *T.forsythia*, *P.gingivalis*). Na maioria dos casos, estudos de associação confirmaram a relação entre espécies já consideradas possíveis patógenos e a etiologia das doenças periodontais, incluindo *P. intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *F. nucleatum*, *P. micra*, *E.corrodens*, *P.nigrescens*, *C.gingivalis*, *T.denticola*, *Treponema socranskii*, *V. parvula* e *C. rectus* (Choi et al., 2000; Papapanou et al., 2000; Sanz et al., 2000; Ximenez-Fyvie et al., 2000; van Winkelhoff et al., 2002; Darout et al., 2003; Haffajee et al., 2004; Lopez et al., 2004; Gajardo et al., 2005; van Winkelhoff et al., 2005). Outras espécies também têm sido associadas com a doença periodontal, porém com menor frequência: *Eubacterium saphenum* e *Mogibacterium timidum* (Mayanagi et al., 2004), *Prevotella corporis*, *Prevotella disiens* e *Peptostreptococcus magnus* (Salari et al., 2004), *E. nodatum* e

Slackia exigua (Booth et al., 2004), e *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Bartonella sp* (Colombo et al., 2002).

Kumar et al. (2003), por meio da técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), observaram associações com periodontite crônica para algumas novas espécies ou filotipos, incluindo clones não-cultiváveis: *Deferribacteres*, *Bacteroides*, OP11 e TM7, bem como as espécies denominadas *E. saphenum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola* e *Cryptobacterium curtum*. Dewhirst et al. (2000) encontraram uma forte associação de uma população de *Treponema* em sítios periodontais, envolvendo espécies cultiváveis e não-cultiváveis: *T. denticola*, *Treponema maltophilum* e *Treponema sp. Smibert-3*. Wyss et al. (1996, 1997, 1999, 2001, 2004) isolaram cinco espécies de treponemas de lesões periodontais e sugeriram a nova nomenclatura: *Treponema amylovorum* sp. nov., *Treponema parvum* sp. nov., *Treponema lecithinolyticum* sp. nov., *Treponema putidum* sp. nov., *Treponema matophilum* sp. nov. Também tem sido sugerido que a espécie *Exiguobacterium aurantiacum* pode representar um papel potencial na doença periodontal (Zijngel et al., 2003). Em 2008, LaGier & Threadgill, mais uma vez, destacaram a possível importante participação do *C. rectus* em alguns casos de doença periodontal. Mais recentemente, Vartoukian et al. (2009) demonstraram a diversidade e morfologia de membros do filo *Synergistetes* na saúde e doença periodontal. A partir dos resultados obtidos, os autores sugeriram a associação da *Synergistetes* OTU 4.2 com a periodontite e, conseqüentemente, com a patogênica da doença.

Desde 1996 a literatura (AAP, 1996) confirmou o papel do *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *P. gingivalis* como os verdadeiros patógenos periodontais. A partir daí, novas investigações sugeriram uma extensa lista com outros microrganismos. Entretanto, muitas das pesquisas que indicaram novos patógenos são estudos de associação que examinaram um número limitado de indivíduos, amostras e/ou espécies. A presente investigação tentará entender a participação de patógenos periodontais por meio da análise da microbiota subgengival de um grande número de indivíduos com doença periodontal. Provavelmente, a análise desses dados tornará evidente o fato de que muitos indivíduos com doença apresentam baixos níveis e proporções dos patógenos considerados verdadeiros (*A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *P. gingivalis*) e, talvez, outras espécies estarão associadas com a doença nesses indivíduos.

1.2 Antibióticos no tratamento da doença periodontal

O entendimento da especificidade do biofilme subgengival, das limitações do controle mecânico da doença periodontal e dos mecanismos que os microrganismos possuem para obter acesso a locais privilegiados, têm levado pesquisadores a desenvolverem novas terapias coadjuvantes à raspagem e alisamento radicular (RAR), para que melhores resultados clínicos e microbiológicos sejam obtidos. Dentre as diversas terapias coadjuvantes, o uso dos antibióticos sistêmicos tem sido empregado no tratamento das doenças periodontais (Van Winkelhoff et al., 1997; Feres et al., 1999a, 1999b, 1999c; Moeintaghavi et al., 2007).

Os antibióticos mais utilizados na literatura como adjuntos à terapia periodontal básica para a periodontite crônica, foram a tetraciclina e seus derivados, doxiciclina e minociclina (Hellden et al., 1979; Slots et al., 1979; Scopp et al., 1980; Ciancio et al., 1982; Lindhe et al., 1983b; Müller et al., 1990; Freeman et al., 1992; Muller et al., 1993; Crout et al., 1996; Loesche et al., 1996; Feres et al., 1999b, 1999c); as penicilinas, principalmente a amoxicilina (Helovuo & Paunio, 1989; Abu-Fanas et al., 1991; Helovuo et al., 1993); o metronidazol (Lindhe et al., 1983a; Loesche et al., 1984, 1987, 1991, 1992, 1996; Feres et al., 1999a; Carvalho et al., 2004; Poulet et al., 2005; Haffajee et al., 2007); e a azitromicina (Mascarenhas et al., 2005; Dastoor et al., 2007; Gomi et al., 2007a; Gomi et al., 2007b; Haffajee et al., 2007; Oteo et al., 2010; Sampaio et al., 2011; Han et al., 2012). Outros estudos mostraram excelentes resultados clínicos e microbiológicos no tratamento da doença periodontal em indivíduos adultos utilizando a associação do metronidazol e da amoxicilina (Pavicic et al., 1994; López et al., 1998, 2000; Winkel, et al., 2001; López et al., 2006; Dannewitz et al., 2007; Moeintaghavi et al., 2007; Cionca et al., 2009; Cionca et al., 2010; Silva et al., 2011; Mestnik et al., 2012; Feres et al., 2012).

1.2.1 Metronidazol combinado à amoxicilina

Em 1928, Alexander Fleming, enquanto trabalhava com variantes de estafilococos no laboratório do St Mary's Hospital em Londres, observou que um fungo ao contaminar uma de suas placas de cultura, promovia uma inibição no crescimento bacteriano. Fleming isolou o fungo em cultura pura e demonstrou que ele produzia uma substância antibacteriana, e que, portanto foi denominada de

penicilina, já que esse fungo pertencia ao gênero *Penicillium*. Essa substância foi posteriormente extraída e seus efeitos antibacterianos foram analisados por Florey & Chain et al. em Oxford, na década de 40 (Florey et al., 1945; Chain, 1948). Esses pesquisadores demonstraram que a penicilina possuía poderosas propriedades quimioterápicas em camundongos infectados e que era atóxica (Hare, 1970).

Todas as penicilinas possuem o mesmo mecanismo básico de ação, isto é, inibem as enzimas responsáveis pela ligação cruzada dos polímeros de peptidoglicano durante o último estágio da síntese da parede celular, resultando na inibição da formação de uma parede celular intacta e completa, e produzindo uma célula bacteriana instável na osmolalidade dos líquidos orgânicos. As penicilinas constituem-se na primeira opção como coadjuvantes no tratamento das infecções odontológicas leves e moderadas. A amoxicilina tem um amplo espectro de atividade contra espécies anaeróbias estritas e facultativas subgengivais (Walker et al., 1985; Kulik et al., 2008). Atua sobre microrganismos cocos e bacilos Gram-negativos devido à capacidade de penetrar nas barreiras lipídicas e na parede celular mais complexa destes microrganismos, agindo sobre as enzimas situadas na parte externa da membrana celular bacteriana lipoprotéica (Montgomery, 2000).

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

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

López & Gamonal (1998) avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos da amoxicilina (500mg, 3x/dia, 7 dias) e do metronidazol (250mg, 3x/dia, 7 dias)

sistêmicos como uma única terapia, durante uma semana, em indivíduos portadores de periodontite crônica moderada e avançada. Foram incluídos no estudo indivíduos que apresentaram pelo menos dois sítios com ≥ 2 mm de perda de NCI. Os parâmetros clínicos mensurados foram SS, IP, PS e NCI. A redução da porcentagem dos sítios com SS foi estatisticamente significativa para o grupo teste nos tempos 2 e 4 meses pós-terapia; e aumentou para o grupo controle, que recebeu apenas medicação placebo. A média dos valores de NIC para os tempos 2 e 4 meses pós-terapia foi estatisticamente menor para o grupo teste em relação ao grupo controle. O grupo teste mostrou significativa redução de sítios com *P. gingivalis* e *Prevotella intermedia* em relação ao grupo controle, mostrando que terapia antibiótica proposta usada isoladamente, altera a proporção de alguns microrganismos subgingivais e promove benefícios clínicos nas condições periodontais.

Ainda nesta linha de pesquisa, em 2000, López et al. selecionaram indivíduos portadores de periodontite crônica avançada e moderada que apresentassem perda de inserção ≥ 2 mm. Os indivíduos foram aleatorizados em dois grupos conforme o estudo anterior, sendo que o grupo teste recebeu metronidazol (250mg, 3x/dia, 7 dias) e amoxicilina (500mg, 3x/dia, 7 dias) sistêmicos como terapia única, e o grupo controle recebeu apenas medicação placebo. As principais diferenças em relação a publicação anterior foi que o regime antibiótico foi repetido após 4 e 8 meses, e a avaliação microbiológica não foi realizada. Os resultados demonstraram que após 2 meses e nas avaliações posteriores, o grupo teste mostrou melhoras clínicas significantes, enquanto o grupo controle demonstrou uma progressiva piora do estado periodontal. Após um ano, os indivíduos do grupo teste mostraram significativo ganho de inserção clínica de 0,43mm ($p=0,005$), diminuição do número de sítios ativos ($p<0,03$), aumento do número de sítios que ganharam inserção clínica ($p<0,01$), redução de PS ($p<0,00006$) e diminuição da porcentagem de SS ($p<0,0005$). Os sítios que mostraram perda de inserção clínica ≥ 2 mm em avaliações sucessivas e abscesso periodontal foram observados somente no grupo controle.

Winkel et al. (2001) avaliaram clínica e microbiologicamente indivíduos com periodontite crônica generalizada avançada. Os indivíduos foram aleatorizados, sendo que o grupo controle foi submetido somente ao tratamento mecânico, e ao grupo teste foi adicionado o uso do metronidazol (250mg, 3x/dia, 7 dias) e da amoxicilina (375mg, 3x/dia, 7 dias) sistêmicos. Observaram as maiores reduções em

PS e ganho de inserção clínica no grupo teste e nos sítios que eram inicialmente \geq 7mm. O número de indivíduos com presença de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. intermedia* no grupo teste mostrou-se significativamente menor. As diferenças na redução da PS entre pacientes com sítios colonizados e não colonizados por *P. gingivalis*, foi particularmente evidente no grupo teste.

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

Moeintaghavi et al. (2007) estudaram a amoxicilina (500mg, 3x/dia, 7 dias) e o metronidazol (250mg, 3x/dia, 7 dias) sistêmicos como coadjuvantes ao tratamento da periodontite crônica. O estudo foi aleatorizado, duplo cego, paralelo e placebo-controlado. Os parâmetros clínicos realizados foram PS, NCI, IP, SS. Os sítios com medidas de PS \geq 5mm foram selecionados para a análise microbiológica. Os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significantes em todos os parâmetros clínicos avaliados em favor do grupo teste, que recebeu a combinação dos antibióticos adjunto à RAR. Paralelamente às mudanças clínicas, no grupo teste houve uma redução significativa no número dos microrganismos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*, em relação aos dados iniciais. Após a terapia, observou-se diferenças estatísticas entre os grupos teste e controle em número de indivíduos negativos para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* ($p=0,033$).

O estudo de Matarazzo et al. (2008), avaliou clínica e microbiologicamente indivíduos fumantes com periodontite crônica, aleatorizados em 3 grupos terapêuticos. O grupo controle recebeu apenas RAR, os grupos testes receberam além da terapia mecânica, metronidazol sistêmico (400mg, 3x/dia, 14 dias) ou a combinação amoxicilina (500mg, 3x/dia, 14 dias) e metronidazol (400mg, 3x/dia, 14 dias). O grupo que recebeu os dois antibióticos associados apresentou as maiores reduções de PS e NIC. Além disso, este grupo apresentou um aumento mais

expressivo das proporções das espécies benéficas e maior redução dos patógenos periodontais.

Cionca et al. (2009) analisaram os efeitos clínicos após acompanhamento de 6 meses da RAR da boca toda em 48 horas combinado a administração do metronidazol e da amoxicilina. Foram analisados 47 indivíduos com periodontite crônica de moderada a avançada, distribuídos em 2 grupos de tratamento, no qual o grupo controle apenas recebeu RAR em 48 horas e o teste além da RAR também recebeu os dois antibióticos: amoxicilina (375mg 3x/dia, 7 dias) e metronidazol (500mg 3x/dia, 7 dias). Não foram observadas diferenças significativas entre os 2 grupos em nenhum dos parâmetros clínicos analisados, porém o grupo teste apresentou menor número de sítios residuais (PS > 4 mm e SS) após 6 meses do tratamento.

Um ano depois (Cionca et al., 2010), os mesmos autores publicaram um estudo no intuito de analisarem se os testes microbiológicos realizados antes do início da terapia seriam úteis para detectar qual perfil microbiológico do indivíduo periodontal se beneficiaria com o uso dos antibióticos. À partir dos mesmos indivíduos do estudo anterior coletaram amostras de biofilme subgengival dos sítios mais profundos de cada quadrante antes e 6 meses após a terapia e, analisaram por meio de PCR (*Polymerase Chain reaction*) a presença de 6 patógenos periodontais (*A. actinomycetencomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* e *T. denticola*). Os autores relataram que neste estudo não foi possível detectar pacientes com perfis microbiológicos específicos que pudessem se beneficiar com o uso dos antibióticos. Após 6 meses da terapia, frequências menores de *P.gingivalis* e *T.forsythia* foram encontradas no grupo que recebeu os antibióticos.

Silva et al. (2011) analisaram os efeitos clínicos e microbiológicos da RAR associada ao uso adjunto do metronidazol (400mg 3x ao dia por 14 dias) sistêmico isolado ou combinado à amoxicilina (500mg 3x ao dia por 14 dias). Os indivíduos portadores de periodontite crônica foram distribuídos em 3 grupos de tratamento, sendo grupo controle (RAR + metronidazol placebo + Amoxicilina placebo), grupo teste 1 (RAR + metronidazol + amoxicilina placebo) e grupo teste 2 (RAR + amoxicilina + metronidazol). Aos 3 meses pós-terapia, o grupo teste 2 exibiu os maiores ganhos de inserção clínica, redução de PS nos sítios intermediários e profundos em relação ao grupo que recebeu apenas a RAR. Além disso, também

mostrou a menor porcentagem de sítios com PS \geq 5mm após o tratamento. A associação dos dois antibióticos à RAR foi a única modalidade de tratamento capaz de reduzir os níveis e proporções de todas as espécies bacterianas do complexo vermelho após análise microbiológica por meio do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*.

Sgolastra et al. (2012) analisaram através de revisão sistemática e metanálise os efeitos da combinação de amoxicilina e metronidazol sistêmico como adjunto à RAR no tratamento da periodontite crônica. Dois examinadores independentes realizaram uma pesquisa eletrônica abrangendo 8 bancos de dados e periódicos internacionais odontológicos publicados nos últimos 15 anos. Foram analisados os parâmetros clínicos de PS e NCI como variáveis primárias e, SS, SUP, mudanças microbiológicas, efeitos adversos, cooperação do paciente e custo benefício como variáveis secundárias de resultado. Dos 517 resumos pesquisados apenas 4 artigos atingiram os critérios de inclusão e foram incluídos na metanálise e os resultados mostraram que a terapia adjunta da RAR combinada ao metronidazol e amoxicilina mostrou benefícios adicionais em termos de NCI e PS. Porém, um maior número de estudos clínicos controlados randomizados são necessários para comprovar esses achados, devido ao pequeno número de estudos incluídos nesta metanálise.

Em 2012 Feres et al. analisaram os efeitos adjuntos da administração de metronidazol (400mg 3x ao dia 14 dias) isolado ou em combinação com a amoxicilina (500mg 3x ao dia 14 dias) em pacientes com periodontite crônica generalizada. Foram selecionados 118 indivíduos e distribuídos em três grupos terapêuticos, um dos grupos recebeu apenas a RAR como tratamento e os outros 2 receberam os antibióticos combinados à RAR, sendo que um recebeu metronidazol isolado e o outro recebeu a combinação dos dois antibióticos. Metade dos indivíduos em cada grupo ainda fizeram bochechos com clorexidina 2x ao dia por 2 meses e então os indivíduos foram monitorados clinicamente em 3, 6 e 12 meses. Em 12 meses pós-terapia, os dois grupos que fizeram o uso dos antibióticos mostraram os menores números de sítios residuais com PS \geq 5mm. Os autores concluíram que o tratamento adjunto de RAR e antibióticos promoveu benefícios clínicos significativos em comparação à RAR isolada.

Apesar dos estudos mostrarem evidentes resultados positivos sobre a associação do metronidazol e da amoxicilina como coadjuvante à RAR no

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

2 PROPOSIÇÃO

Analisar a influência de diferentes perfis de similaridade da microbiota subgengival de indivíduos com diagnóstico clínico de periodontite crônica na resposta a duas terapias periodontais – raspagem e alisamento radiculares associados a antibióticos ou a placebo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção da amostra

Os dados iniciais dos exames clínico e microbiológico de 300 indivíduos participantes de diferentes pesquisas clínicas sobre terapia periodontal, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Guarulhos (UnG) foram incluídos neste estudo. A amostra total foi selecionada, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão abaixo descritos, a partir de um banco de dados com 300 pacientes. Independentemente do estudo ao qual o indivíduo participava, a seleção foi realizada por mestrandos em Odontologia (n=3), área de concentração em periodontia, sob supervisão dos professores da disciplina. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e coletas necessárias, além das terapias propostas. A participação foi voluntária e os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, estando de acordo com a Resolução nº 196/96 das Diretrizes e Normas do Conselho Nacional de Saúde. Todas as pesquisas de origem dos pacientes foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

Para a inclusão no estudo, a seleção dos participantes respeitou os seguintes critérios:

- Voluntários portadores de periodontite generalizada - crônica ou agressiva;
- Possuir um mínimo de 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Mínimo de seis dentes com pelo menos um sítio interproximal, não contíguo, com PS e NCI entre 5 e 10mm, preferencialmente distribuídos em sextantes distintos.

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Gestantes ou lactantes;
- Histórico de tratamento periodontal prévio nos últimos seis meses;
- Histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- Histórico de uso de antissépticos orais nos últimos seis meses;
- Doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento;
- Reabilitações protéticas extensas.

3.3 Delineamento experimental

Após a seleção, os participantes do estudo responderam a um questionário de saúde (anamnese). Inicialmente todos os indivíduos foram submetidos a exame clínico-periodontal completo e coleta de amostras de biofilme subgengival no início do estudo e 3 meses após o término da terapia, de acordo com o protocolo especificado nas duas sessões seguintes (ver 3.4 Avaliação clínico-periodontal e 3.5 Avaliação microbiológica). Todos os indivíduos receberam terapia periodontal de acordo com o protocolo terapêutico específico da pesquisa a qual ele pertencia (ver 3.7 Procedimentos terapêuticos).

3.4 Avaliação clínico-periodontal

O exame clínico-periodontal foi efetuado no início do estudo a fim de realizar o diagnóstico do indivíduo. Três examinadores foram treinados e calibrados com o objetivo de conseguir a máxima reprodutibilidade nas medições realizadas por cada um deles e entre eles. A metodologia utilizada para a calibração foi preconizada por Araújo et al. (2003), que avaliaram o erro padrão da medida (e.p.m.) e o erro médio percentual (e.m.p.) para os parâmetros clínicos periodontais contínuos (PS e NCI). O e.p.m e o e.m.p variaram entre 0,09mm-0,31mm e 2,0%-5,79%, respectivamente. Para as variáveis categóricas considerando a presença ou ausência do parâmetro clínico, foi realizada a média do nível de concordância para cada examinador e entre eles, obtendo-se concordância superior a 92% (Teste Kappa).

As mensurações clínicas foram realizadas em seis sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes (exceto terceiros molares), utilizando-se sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15 HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os parâmetros clínicos avaliados incluíram:

Índice de Placa Visível- (IPV) (Ainamo; Bay, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa supragengival visível;

Índice de Sangramento Gengival - (ISG) (Ainamo; Bay, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento da gengiva marginal, após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival;

Profundidade de Sondagem - (PS): distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;

Nível Clínico de Inserção - (NCI): distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;

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

Supuração - (SUP): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de SUP espontânea ou após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada.

3.5 Avaliação microbiológica

3.5.1 Seleção dos sítios-teste

Foram selecionados nove sítios em cada voluntário, distribuídos uniformemente de acordo com a PS inicial nas seguintes categorias (três 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 três sítios profundos não foi encontrado, o mesmo foi substituído por 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.

3.5.2 Checkerboard DNA-DNA Hybridization

Cepas bacterianas e condições de crescimento

Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) ou do *Forsyth Institute* (Boston, MA, USA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e cultivado em ágar triptose de soja contendo 5% de sangue de ovelha desfibrinado (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, USA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂, 10%H₂). Algumas bactérias foram cultivadas em meios de cultura enriquecidos de forma a suprir suas necessidades nutricionais. *T. forsythia*, por exemplo, foi cultivada em ágar triptose de soja com 5% de sangue de ovelha desfibrinado e 10 µg/ml de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado, 0,3µg/ml de menadiona (Sigma) e 5µg/ml de hemina (Sigma). *T. denticola* e *T. socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco) suplementado com 1mg/ml de glicose, 400µg/ml de niaciamida, 150µg/ml espermina tetraidroclorídrica, 20µg/ml de isobutirato de Na, 1mg/ml de L-cisteína, 5µg/ml de tiamina pirofosfato e 0,5% de soro bovino.

Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram anaerobicamente cultivadas na superfície de ágar-sangue contido em placas de Petri, com exceção das duas espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo de cultura, por 3 - 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos de microcentrifuga de 1,5ml contendo 1ml de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). As células foram lavadas duas vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500 gp por 10 minutos. Em seguida, as células das cepas Gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C₁₂H₂₅NaO₄S) a 10% e proteinase K em uma concentração de 20mg/ml (Sigma). As cepas Gram-positivas foram lisadas em 150µl de uma mistura enzimática contendo 15mg/ml de lisozima (Sigma) e 5mg/ml de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão de TE (pH 8,0). O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al.(1989). As sondas multi-genômicas

(*whole-genomic*) foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA), de acordo com o método descrito por Feinberg; Vogelstein (1983). As espécies bacterianas avaliadas foram selecionadas segundo sua associação com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (Haffajee; Socransky, 1994).

Coleta de amostras de biofilme subgengival

Após a remoção do biofilme supragengival, as amostras de biofilme subgengival foram coletadas utilizando curetas Gracey do tipo mini-five (HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), posicionadas na porção mais apical dos nove sítios previamente selecionados para o exame microbiológico. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150µl de solução TE (pH 7,6), ao qual foram adicionados 100µl de NaOH a 0,5 M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por longos períodos de tempo. Estes tubos foram então identificados e armazenados em freezer a -20° C até serem analisados por meio da técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para as 40 cepas bacterianas descritas na Tabela 1, no laboratório de microbiologia da Universidade Guarulhos.

Hibridização DNA-DNA

As suspensões contidas nos tubos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5 M. Cada suspensão de biofilme bacteriano contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* (Immunelect, Cambridge, MA, USA- Figura 1) ficando, assim, concentrada em uma membrana de *nylon* (15 x 15cm) com carga positiva (Boehringer Mannheim). As duas últimas canaletas do *Minislot* (Immunelect) foram ocupadas por controles contendo uma mistura do DNA das espécies de microrganismos investigadas pelas sondas, nas concentrações correspondentes a 10^5 e 10^6 células, ou seja, 1ng e 10ng de DNA de cada espécie, respectivamente (Socransky et al., 1994; Haffajee et al., 1997a, b). A membrana foi então removida do *Minislot* (Immunelect) e o DNA nela concentrado foi fixado por meio de aquecimento em forno a 120° C por 20 minutos.

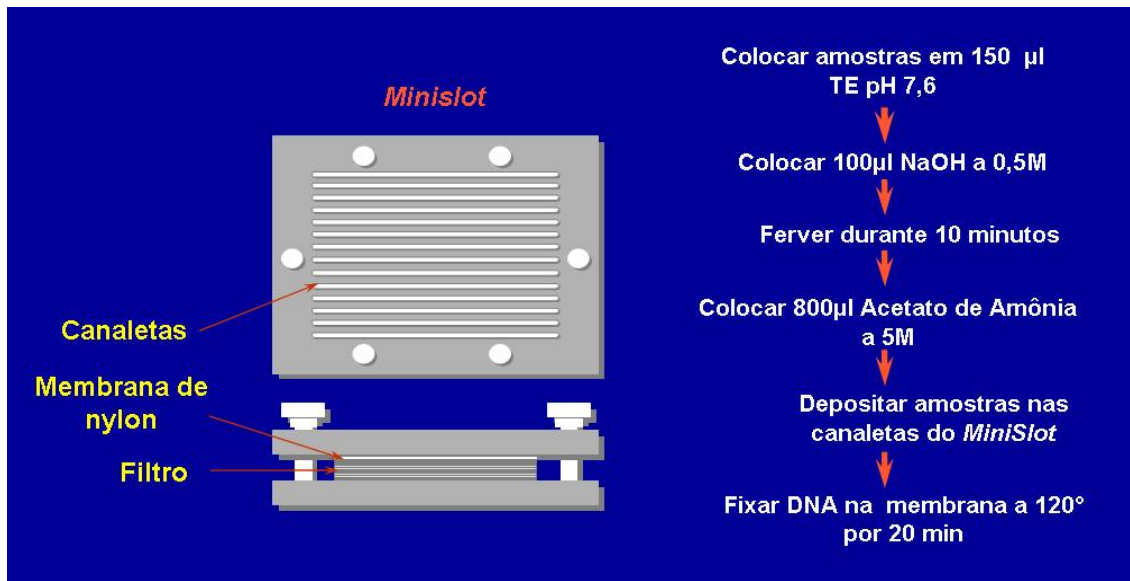


Figura 1. Representação gráfica do *Minislot* (Immunelectics, Cambridge, MA, USA) e resumo da preparação e deposição das amostras de biofilme subgengival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

A membrana foi pré-hibridizada a 42° C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína (Sigma), 5 x *standard saline citrate* - SSC (1 x SSC = 150mM NaCl, 15mM de citrato de sódio, pH 7,0), 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim).

Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* (Immunelectics, Figura 2) com as linhas de DNA perpendiculares às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* (Immunelectics) foi adicionada uma sonda de DNA (diluída a aproximadamente 20ng/ml) em 130 μ l de uma solução de hibridização composta de 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura (Boehringer Mannheim), 10% de sulfato de dextrano e 1% de caseína (Sigma). A hibridização ocorreu por um período mínimo de 20 horas, a 42° C.

Tabela 1. Relação das cepas 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
Actinomyces sp		Complexo Laranja (cont.)	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	23860 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp. <i>nucleatum</i>	25586 ^a
<i>Actinomyces israelii</i>	12102 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp. <i>polymorphum</i>	10953 ^a
<i>Actinomyces naeslundii</i> I	12104 ^a	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp. <i>vincentii</i>	49256 ^a
<i>Actinomyces oris</i>	43146 ^a	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693 ^a
Complexo Roxo		<i>Parvimonas micra</i>	33270 ^a
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929 ^a	<i>Prevotella intermedia</i>	25611 ^a
<i>Veillonella parvula</i>	10790 ^a	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563 ^a
Complexo Amarelo		<i>Streptococcus constellatus</i>	27823 ^a
<i>Streptococcus gordonii</i>	10558 ^a	Complexo Vermelho	
<i>Streptococcus intermedius</i>	27335 ^a	<i>Tannerella forsythia</i>	43037 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	49456 ^a	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277 ^a
<i>Streptococcus oralis</i>	35037 ^a	<i>Treponema denticola</i>	B1 ^b
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556 ^a	Outras Espécies	
Complexo Verde		<i>Eubacterium saburreum</i>	33271 ^a
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> a + b	29523 ^a	<i>Gemella morbillorum</i>	27824 ^a
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624 ^a	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201 ^a
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596 ^a	<i>Neisseria mucosa</i>	19696 ^a
<i>/Capnocytophaga sputigena</i>	33612 ^a	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845 ^a
<i>Eikenella corrodens</i>	23834 ^a	<i>Propionibacterium acnes</i> I + II	11827 ^a
Complexo Laranja			11828 ^a
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236 ^a	<i>Selenomonas noxia</i>	43541 ^a
<i>Campylobacter rectus</i>	33238 ^a	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397 ^a
<i>Campylobacter showae</i>	51146 ^a	<i>Treponema socranskii</i>	S1 ^b
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099 ^a		

^a ATCC (American Type Culture Collection)

^bForsyth Institute

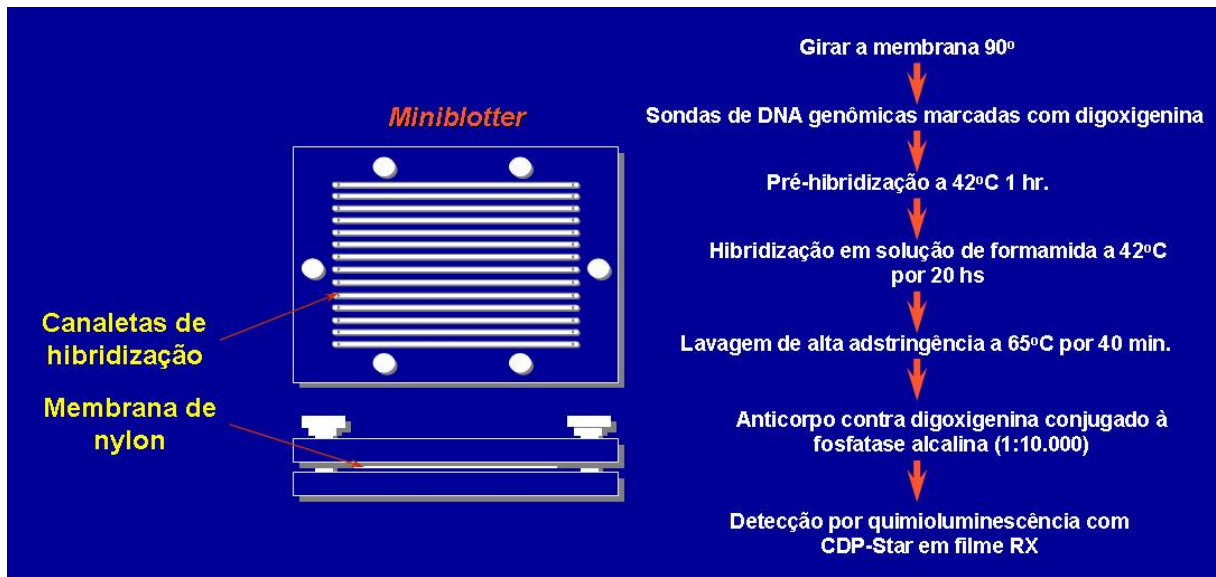


Figura 2. Representação gráfica do *Miniblotter* (Immunelectrics, Cambridge, MA, USA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* (Immunelectrics) lavada por 40 minutos, a 65°C numa solução adstringente composta de 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de Na₂HPO₄, a fim de remover as sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico (C₄H₄O₄), 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi depois lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1 M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, 50 mM de MgCl₂, pH 9,5.

Os próximos passos foram a incubação da membrana por 45 minutos a 37°C em uma solução detectora à base de fosfatase alcalina, CDP-StarTM Detection Reagent (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England, UK). A seguir, a membrana foi colocada em um cassete, Chassi Radiográfico 30x40cm (Konex, Ind. Bras., SP, Brasil), sob um filme radiográfico de marca KodakX-Omat K, 18x24cm (Kodak Brasileira Com. e Ind. Ltda, São José dos Campos, SP, BR) por 40

minutos. O filme foi posteriormente revelado (Figuras 3 e 4) manualmente pelo método convencional temperatura-tempo, de acordo com orientações do fabricante. As soluções utilizadas foram da marca Kodak, sempre mantidas à temperatura de 20°C.

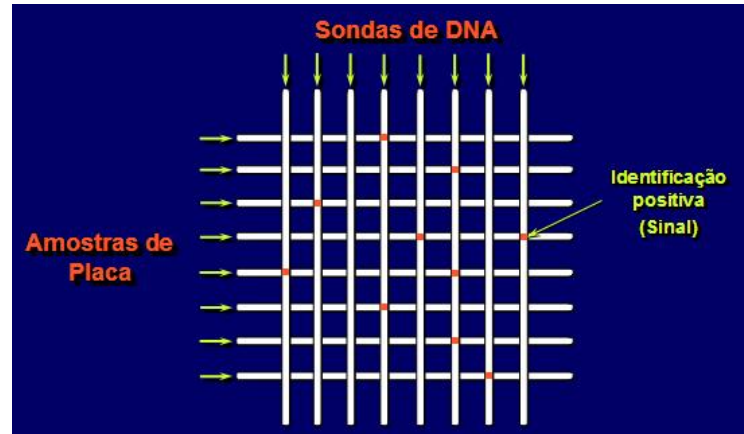


Figura 3. Representação gráfica do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*).

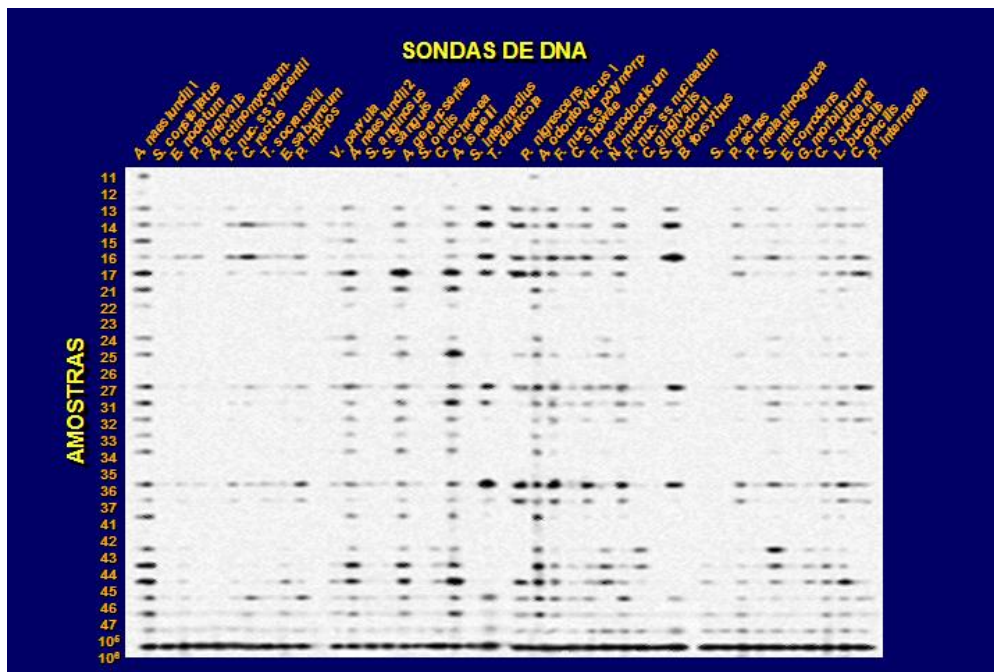


Figura 4. Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica *Checkerboard*

DNA-DNA Hybridization). Nesta figura estão apresentadas 40 bactérias, e as amostras de biofilme são de todos os dentes de um mesmo indivíduo.

A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, da seguinte forma: cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa foi comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois 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 aproximadamente 10^5 células; 3, entre 10^5 e 10^6 células; 4 aproximadamente 10^6 células e 5, mais de 10^6 células (Tabela 2). Estes registros foram então utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas nos sítios e indivíduos do estudo.

Tabela 2. 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 10^5 células	10.000
2	Aproximadamente 10^5 células	100.000
3	Entre 10^5 e 10^6 células	500.000
4	Aproximadamente 10^6 células	1.000.000
5	Mais de 10^6 células	10.000.000

3.6 Perfil de similaridade

Os dados microbiológicos foram expressos em percentual de sondas de DNA para cada espécie dentro de cada sítio. Em seguida, os dados microbiológicos dos três sítios rasos, três sítios intermediários e três sítios profundos foram agrupados individualmente dentro de cada indivíduo. Os dados microbiológicos foram ajustados conforme o perfil clínico do exame inicial. Posteriormente a este ajuste, matrizes de similaridade foram construídas utilizando-se o coeficiente de

Chord (Ludwig; Reynolds, 1988) e os resultados foram ponderados pela classificação da associação das médias (Sneath; Sokal, 1973). Considerou-se um perfil de similaridade de 67%.

3.7 Procedimentos terapêuticos

Dos 300 indivíduos incluídos na análise 73 receberam a terapia RAR associada a placebos (Grupo RAR) e 227 receberam a RAR associada ao uso de antibióticos sistêmicos (Grupo ANT), sendo que 113 tomaram metronidazol (MTZ, 400mg, 3x/dia, 14 dias) + placebo, e 114 tomaram metronidazol (MTZ, 400mg, 3x/dia, 14 dias) + amoxicilina (AMX, 500mg, 3x/dia, 14 dias).

* Grupo RAR: RAR + placebos (2 frascos - 3x/dia, 14 dias)

* Grupo ANT: RAR + MTZ (400mg, 3x/dia, 14 dias) + placebo (3x/dia, 14 dias)

RAR + MTZ (400mg, 3x/dia, 14 dias) + AMX (500mg, 3x/dia, 14 dias)

3.7.1 Terapia periodontal básica

Após o registro das medidas clínicas e coleta de biofilme subgingival para a análise microbiológica, todos os indivíduos foram submetidos a sessões de adequação do meio bucal que incluem instrução de higiene bucal, raspagem supragengival de todos os dentes com instrumentos manuais, desgaste de restaurações em excesso, selamento provisório das lesões cariosas cavitadas, curativos endodônticos e exodontias. Durante as sessões de instrução de higiene bucal, os indivíduos foram orientados a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental Colgate Total® (Anacol Ind. E Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Em seguida, os indivíduos receberam seis sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy) sob anestesia local. Três periodontistas treinados realizaram a RAR, que foi feita em 4 a 6 sessões de aproximadamente 1h, distribuídas em um período de 14 dias. Os sítios mais comprometidos foram tratados com prioridade. Os três periodontistas não tiveram conhecimento do grupo terapêutico ao qual cada paciente pertencia.

3.7.2 Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos e placebos

Os antibióticos e os placebos foram manipulados em uma Farmácia de Manipulação na cidade de Guarulhos, especialmente para os estudos clínicos. Todas as cápsulas (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 indivíduos foram orientados a retornar na próxima semana à clínica de Odontologia-UnG trazendo os frascos vazios para receber outros frascos com medicamento. Além disso, também foram monitorados de 4 em 4 dias, pessoalmente ou via telefone. Após o término do período de administração da droga e/ou placebo, os indivíduos responderam a um questionário sobre possíveis reações adversas da medicação.

Independentemente do grupo ao qual o paciente pertencia, a administração dos medicamentos sistêmicos e/ou placebos via oral, por 14 dias, foi iniciada em conjunto com a terapia periodontal básica.

3.8 Análise estatística

3.8.1 Avaliação clínica

A média das medidas clínicas de PS e NCI, assim como a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, SS e supuração foram computadas para cada indivíduo e, posteriormente, dentro do grupo. As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste Kruskal-Wallis e teste U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$).

3.8.2 Avaliação microbiológica

Os dados microbiológicos foram computados para cada indivíduo e depois dentro dos *clusters*. Em seguida foram expressos em percentual das sondas de DNA (proporção). Diferenças nas proporções das diferentes espécies entre os *clusters* foram avaliadas utilizando o teste Kruskal-Wallis e teste U de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida em 5%.

4 RESULTADOS

A análise dos dados obtidos na avaliação clínica e microbiológica dos 300 indivíduos está apresentada nas Figuras 5 - 6, e Tabelas 3 - 5. Com o objetivo de estudar o perfil de similaridade dos indivíduos, dendogramas foram construídos de acordo com os dados microbiológicos. Considerando um perfil de similaridade de 67%, os resultados demonstraram a formação de seis *clusters* entre os 300 indivíduos selecionados para o estudo. Porém, 11 desses indivíduos não se enquadraram em nenhum dos perfis de similaridade e, dessa forma, foram reunidos em um único grupo.

A Figura 5 apresenta os dados de baseline para a média do percentual das sondas de DNA das 40 espécies bacterianas analisadas e o número total de indivíduos incluídos em cada um dos sete *clusters* encontrados. Percentuais de 35 espécies mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os *clusters*, sendo que apenas os percentuais de *A.actinomycescomitans*, *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. showae* e *P. melaninogenica* não diferiram. São notáveis os baixos percentuais das bactérias do complexo vermelho nos grupos II e III.

As proporções dos complexos microbianos no baseline para os *clusters* estão apresentadas na Figura 6. As espécies bacterianas identificadas por meio das sondas de DNA foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Socransky et al. (1998). As proporções das espécies pertencentes a cada complexo foram somadas e a proporção total de cada complexo foi determinada. As maiores proporções do complexo vermelho foram observadas nos *clusters* V (31,9%) e VI (49,3 %), seguidos dos *clusters* I (21,9%), IV (20,5%), II (17,3%) e III (9,9%). Em relação ao complexo laranja, o *cluster* V (39,5%) seguido dos *clusters* IV (36,7%) e III (36,6%) apresentaram as proporções mais elevadas. Por outro lado, inesperadamente, os microrganismos considerados benéficos se destacaram em alguns *clusters* com proporções elevadas. Os *Actinomyces sp* representaram 23,4% da microbiota do *cluster* I, e o complexo amarelo representou 18,3% no *cluster* II.

As Tabelas 3 e 4 apresentam a média das variáveis demográficas e clínicas nos dois grupos experimentais. Tanto para o grupo terapêutico que recebeu apenas a raspagem e alisamento radiculares (Tabela 3) como para o grupo que

recebeu raspagem e alisamento radiculares associados ao uso de antibióticos (Tabela 4) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os *clusters* para as variáveis PS e NCI.

Considerando a redução na média do número de sítios residuais com PS $> 5\text{mm}$ (Tabela 5), a análise dos dados demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os *clusters*.

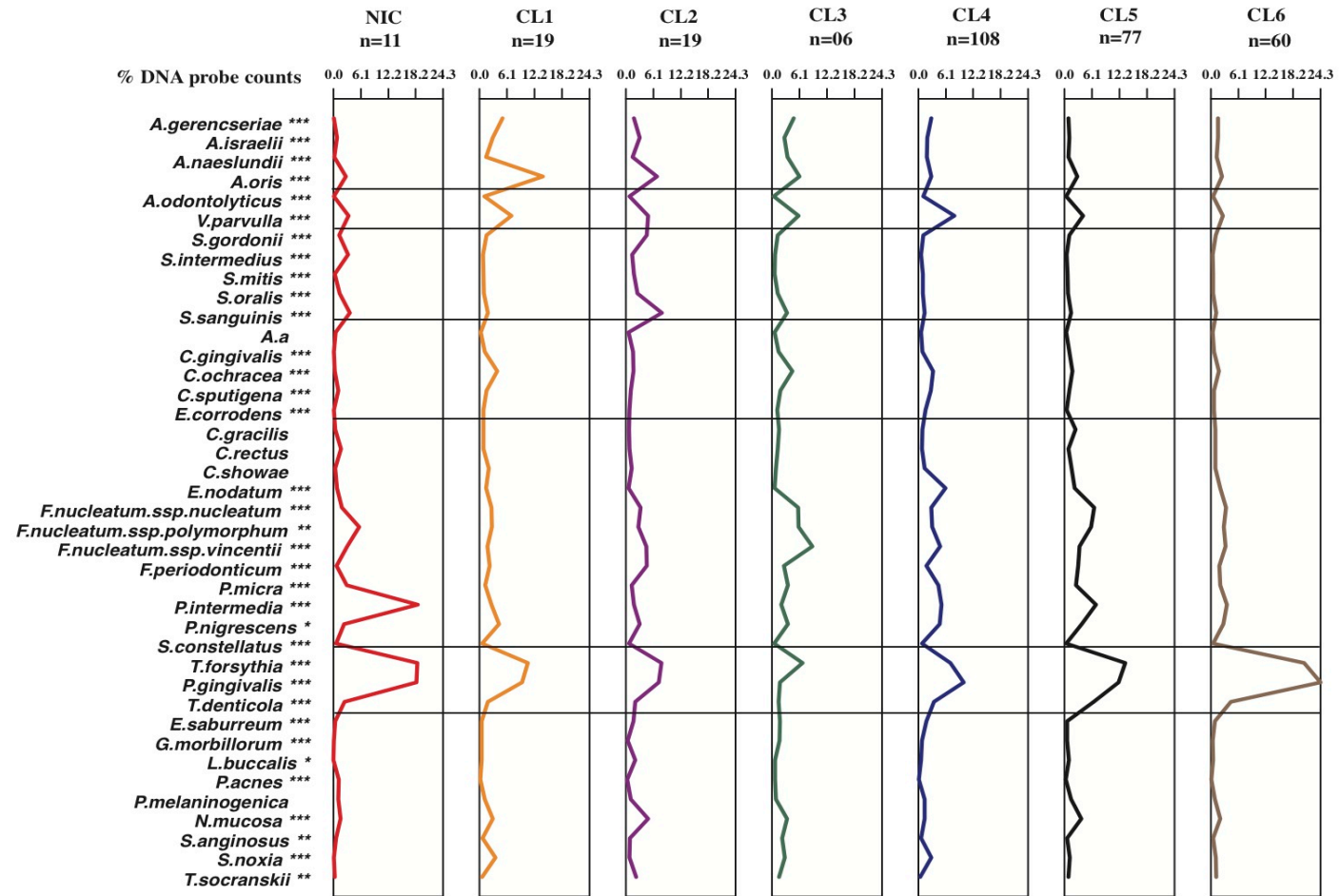


Figura 5. Proporção das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival nos diferentes *clusters* formados. NIC: Não incluído nos *clusters*. Teste Kruskal-Wallis (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

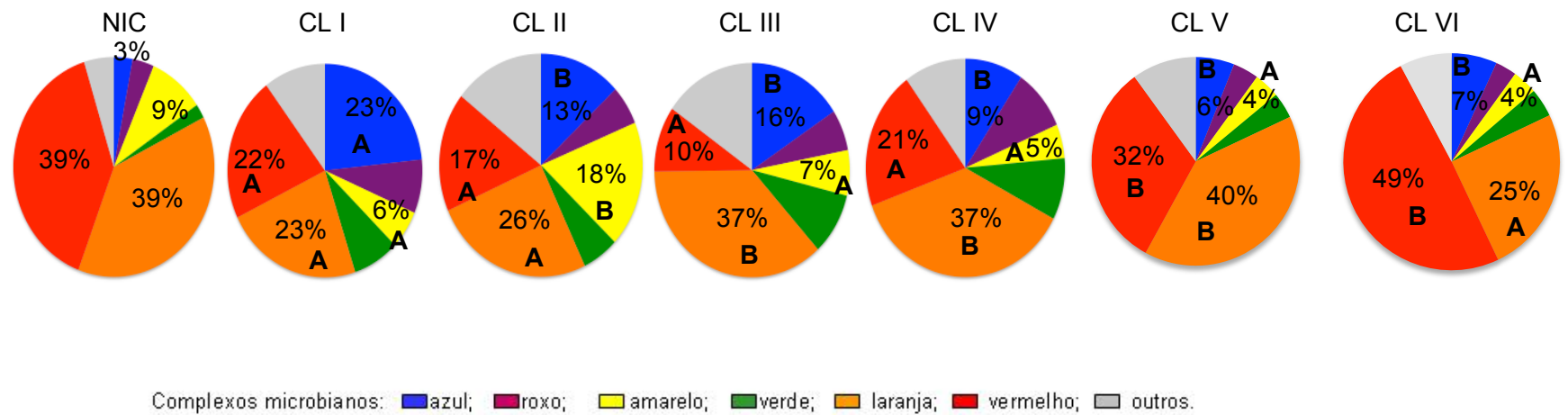


Figura 6. Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgingival nos diferentes *clusters* formados. NIC: Não incluído nos *clusters*. Teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$, letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos).

Tabela 3. Média (\pm DP) dos parâmetros demográficos e clínicos de indivíduos com periodontite tratados com raspagem e alisamento radicular, nos diferentes *clusters* formados.

Variáveis	Tempo	Grupos Experimentais							KW p
		NIC (n=5)	I (n=4)	II (n=5)	III (n=1)	IV (n=18)	V (n=28)	VI (n=12)	
Idade (anos)	Baseline	30,0 \pm 0,0	42,7 \pm 5,1	39,4 \pm 1,7	43,0 \pm 0,0	48,5 \pm 12,1	43,1 \pm 7,5	47,4 \pm 8,9	0,281
Tabagistas	Baseline	0,5 \pm 0,7	0,2 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	0,8 \pm 0,4	0,2 \pm 0,4	0,5 \pm 0,5	0,005
PS (mm)	baseline	4,2 \pm 0,5	3,7 \pm 0,7	3,5 \pm 0,2	3,2 \pm 0,0	4,2 \pm 0,5	4,1 \pm 0,8	4,0 \pm 0,7	0,114
	90 dias	3,2 \pm 0,5	2,9 \pm 0,4	2,8 \pm 0,1	2,3 \pm 0,0	3,2 \pm 0,4	3,3 \pm 0,7	3,2 \pm 0,6	0,069
NCI (mm)	baseline	4,2 \pm 0,5	4,01 \pm 1,0	3,9 \pm 0,5	4,6 \pm 0,0	4,6 \pm 0,8	4,8 \pm 0,9	4,6 \pm 0,7	0,225
	90 dias	3,6 \pm 0,9	3,4 \pm 1,1	3,2 \pm 0,5	4,2 \pm 0,0	3,9 \pm 0,8	4,3 \pm 0,9	3,9 \pm 0,8	0,133
% sítios com:									
Biofilme visível	baseline	86,0 \pm 1,0	82,0 \pm 19,0	73,0 \pm 22,0	49,0 \pm 0,0	75,0 \pm 13,0	80,0 \pm 14,0	77,0 \pm 17,0	0,451
	90 dias	54,0 \pm 30,0	34,0 \pm 21,0	31,0 \pm 22,0	2,0 \pm 0,0	50,0 \pm 26,0	55,0 \pm 26,0	45,0 \pm 23,0	0,167
Sangramento gengival	baseline	43,0 \pm 42,0	28,0 \pm 31,0	24,0 \pm 24,0	0,0 \pm 0,0	72,0 \pm 19,0	37,0 \pm 26,0	30,0 \pm 25,0	0,000
	90 dias	12,0 \pm 16,0	18,0 \pm 19,0	11,0 \pm 13,0	0,0 \pm 0,0	38,0 \pm 28,0	24,0 \pm 19,0	15,0 \pm 12,0	0,049
Sangramento à sondagem	baseline	85,0 \pm 9,0	75,0 \pm 17,0	50,0 \pm 17,0	29,0 \pm 0,0	86,0 \pm 14,0	78,0 \pm 21,0	75,0 \pm 26,0	0,026
	90 dias	65,0 \pm 6,0	28,0 \pm 25,0	21,0 \pm 28,0	8,0 \pm 0,0	53,0 \pm 30,0	61,0 \pm 24,0	50,0 \pm 28,0	0,056
Supuração	baseline	6,0 \pm 4,0	0,0 \pm 0,0	3,0 \pm 6,0	0,0 \pm 0,0	3,0 \pm 5,0	1,0 \pm 2,0	1,0 \pm 1,0	0,207
	90 dias	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 2,0	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 1,0	0,676

PS: Profundidade de Sondagem; NCI: Nível Clínico de Inserção; NIC: Não incluído nos *clusters*.

KM: Teste Kruskal-Wallis (números em itálico representam as diferenças estatísticas entre os *clusters*, $p < 0,05$).

Tabela 4. Média (\pm DP) dos parâmetros demográficos e clínicos de indivíduos com periodontite tratados com raspagem e alisamento radicular associada ao uso de antibióticos (metronidazol ou metronidazol+amoxicilina), nos diferentes *clusters* formados.

Variáveis	Tempo	Grupos Experimentais							KW p
		NIC (n=6)	I (n=15)	II (n=14)	III (n=5)	IV (n=90)	V (n=49)	VI (n=48)	
Idade (anos)	baseline	29,0 \pm 1,4	42,8 \pm 8,7	46,4 \pm 11,0	40,4 \pm 10,3	46,5 \pm 8,1	41,4 \pm 10,4	39,2 \pm 11,0	0,003
Tabagistas	baseline	0,5 \pm 0,7	0,4 \pm 0,5	0,07 \pm 0,2	0,2 \pm 0,4	0,2 \pm 0,4	0,2 \pm 0,3	0,1 \pm 0,3	0,141
PS (mm)	baseline	4,3 \pm 1,0	3,8 \pm 0,5	3,6 \pm 0,7	3,6 \pm 0,3	4,0 \pm 0,7	3,9 \pm 0,8	4,0 \pm 0,6	0,406
	90 dias	3,3 \pm 0,3	2,7 \pm 0,3	2,7 \pm 0,6	2,9 \pm 0,2	2,8 \pm 0,4	2,9 \pm 0,5	2,8 \pm 0,4	0,321
NCI (mm)	baseline	4,4 \pm 0,8	4,3 \pm 0,7	4,0 \pm 0,9	4,3 \pm 0,7	4,6 \pm 1,0	4,4 \pm 1,0	4,4 \pm 0,9	0,599
	90 dias	3,6 \pm 0,5	3,5 \pm 0,7	3,2 \pm 1,0	3,7 \pm 0,7	3,9 \pm 1,1	3,5 \pm 0,9	3,5 \pm 0,8	0,120
% sítios com:									
Biofilme visível	baseline	50,0 \pm 1,0	64,0 \pm 18,0	66,0 \pm 25,0	61,0 \pm 28,0	62,0 \pm 19,0	75,0 \pm 17,0	73,0 \pm 18,0	0,002
	90 dias	53,0 \pm 8,0	35,0 \pm 21,0	36,0 \pm 26,0	49,0 \pm 35,0	29,0 \pm 15,0	40,0 \pm 22,0	39,0 \pm 22,0	0,053
Sangramento gengival	baseline	13,0 \pm 11,0	37,0 \pm 23,0	23,0 \pm 26,0	19,0 \pm 13,0	47,0 \pm 25,0	34,0 \pm 26,0	36,0 \pm 24,0	0,000
	90 dias	14,0 \pm 6,0	14,0 \pm 13,0	7,0 \pm 13,0	10,0 \pm 10,0	23,0 \pm 15,0	15,0 \pm 15,0	18,0 \pm 20,0	0,000
Sangramento à sondagem	baseline	70,0 \pm 13,0	63,0 \pm 21,0	55,0 \pm 18,0	52,0 \pm 16,0	67,0 \pm 22,0	75,0 \pm 19,0	74,0 \pm 18,0	0,004
	90 dias	44,0 \pm 11,0	28,0 \pm 26,0	21,0 \pm 25,0	25,0 \pm 19,0	33,0 \pm 19,0	37,0 \pm 27,0	33,0 \pm 29,0	0,247
Supuração	Baseline	18,0 \pm 10,0	2,0 \pm 3,0	2,0 \pm 3,0	4,0 \pm 9,0	10,0 \pm 11,0	4,0 \pm 9,0	4,0 \pm 7,0	0,000
	90 dias	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,003

PS: Profundidade de Sondagem; NCI: Nível Clínico de Inserção; NIC: Não incluído nos *clusters*.

KM: Teste Kruskal-Wallis (números em itálico representam as diferenças estatísticas entre os *clusters*, $p < 0,05$).

Tabela 5. Redução na média do número de sítios residuais com profundidade de sondagem >5mm nos diferentes *clusters* formados, para os dois grupos terapêuticos que receberam apenas a raspagem e alisamento radicular ou raspagem e alisamento radicular associada ao uso de antibióticos (metronidazol ou metronidazol+amoxicilina).

Grupo		Grupos Experimentais							KW p
Terapêutico	Variável	NIC	I	II	III	IV	V	VI	
RAR	Número de indivíduos	5	4	5	1	18	28	12	
	Número de sítios com PS>5mm	41,0 ± 14,1	25,7 ± 9,3	18,6 ± 6,2	18,0 ± 0,0	37,4 ± 20,1	24,3 ± 15,3	27,3 ± 22,1	0,746
ANT	Número de indivíduos	6	15	14	5	90	49	48	-
	Número de sítios com PS>5mm	21,5 ± 14,8	36,0 ± 18,2	21,2 ± 12,0	23,4 ± 10,8	34,1 ± 18,8	33,1 ± 17,9	39,5 ± 20,4	0,065

PS: Profundidade de Sondagem; NIC: Não incluído nos *clusters*.

KM: Teste Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O início e a progressão da doença periodontal estão associados à presença de microrganismos específicos no sulco gengival e/ou sítio periodontal. Os subprodutos derivados desse metabolismo microbiano também contribuem para o desenvolvimento da doença periodontal (Pennel; Keagle, 1977; Loesche et al., 1985), já que estimulam uma resposta do sistema imunológico do hospedeiro. À medida que se estabelecem alterações inflamatórias no tecido gengival induzidas pelo biofilme, ocorrem alterações quantitativas e qualitativas da microbiota dental (Løe et al., 1965). Na década de 90, com o desenvolvimento de técnicas imunológicas e de biologia molecular, foi possível a detecção mais precisa das espécies bacterianas que compõem os biofilmes orais e a relação dos diferentes perfis microbianos com as diferentes formas de periodontite (Christersson et al., 1987; Socransky; Haffajee, 1994b; Ávila-Campos et al., 1999; Gomes et al., 2006).

A compreensão mais detalhada sobre a composição do biofilme supra e subgengivais associados ao periodonto saudável ou doente permitiu que se traçassem metas microbiológicas para as terapias periodontais. Esse foi um dos passos mais importantes no sentido de aperfeiçoar e, conseqüentemente, personalizar as diversas formas de tratamento em periodontia. Apesar de todo o conhecimento científico dos dias atuais ainda não é sabido o motivo que leva alguns pacientes sistemicamente saudáveis a responderem de maneira tão limitada às diversas formas de terapia periodontal (Haffajee et al., 1997; Rosling et al., 2001). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo analisar possíveis diferenças no perfil de similaridade da microbiota subgengival de indivíduos com diagnóstico clínico de periodontite crônica na resposta a duas terapias periodontais – raspagem e alisamento radiculares (RAR) associados a antibióticos ou a placebo.

Primeiramente, é relevante a discussão do perfil clínico e microbiológico dos indivíduos selecionados. Os resultados desta investigação demonstraram que as médias de PS e NCI dos indivíduos participantes do estudo (Tabela 3) são compatíveis com a condição clínica de periodontite moderada-severa (Faveri et al., 2006; Matarazzo et al., 2008; Feres et al.,

2012). Além disso, em relação aos achados microbiológicos (Figuras 6 e 7), *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* estavam em níveis e proporções elevados. Dados similares foram reportados por Lopez et al. (2004) e Colombo et al. (2002), que também utilizaram a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* para avaliar 40 espécies subgingivais em 26 chilenos e 25 brasileiros com periodontite crônica, respectivamente.

Em relação ao perfil de similaridade, com base nos resultados deste estudo é possível sugerir que existem variações quantitativas e qualitativas no perfil de colonização bacteriana do ambiente subgingival entre diferentes indivíduos. Esta variação foi recentemente descrita por Teles et al. (2006) utilizando a técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* e por outros autores que usaram cultura ou métodos moleculares (Kamma et al., 1995; Moore et al., 2000). O único artigo publicado em periódico que usou uma metodologia semelhante à aplicada nesta investigação foi o estudo de Teles et al. (2006). Dados microbiológicos de 461 indivíduos com doença periodontal obtidos pela técnica do *Checkerboard DNA-DNA Hybridization* foram analisados por meio de um dendograma, resultando na formação de dez clusters a partir da aplicação do percentual de similaridade de 43%. Os autores sugeriram que os indivíduos podem possuir perfis de colonização microbiana diferenciados, indicando que diversos patógenos podem ser responsáveis pela etiologia da doença periodontal. Também é importante ressaltar a comparação dos resultados obtidos nos dois estudos (Teles et al., 2006 e o nosso). Considerando um percentual de similaridade de 67%, seis *clusters* foram formados após a análise dos dados desta investigação. Além disso, ambos os estudos encontraram alguns *clusters* com baixos níveis e proporções do complexo vermelho, o que não é compatível com a doença periodontal.

Outro ponto importante em relação aos resultados obtidos pode ser destacado quando se foca na terapia periodontal. Os principais objetivos da terapia periodontal são redução da profundidade de sondagem, do sangramento à sondagem e da supuração e aumento do nível de inserção. Os estudos científicos demonstram que esses resultados clínicos são atingidos quando os níveis, proporções e percentual de sítios colonizados por diferentes periodontopatógenos são efetivamente reduzidos. Adicionalmente, deve-se estabelecer uma nova comunidade microbiana no biofilme subgingival com

níveis e proporções mais elevadas de microrganismos compatíveis com saúde periodontal (Socransky; Haffajee, 1994; Teles et al., 2006). Aparentemente, esse perfil microbiano compatível com saúde é mais facilmente instalado na cavidade oral quando a terapia empregada permite uma rápida e drástica redução dos patógenos, não somente nos sítios profundos, mas em toda a cavidade oral, incluindo sítios rasos e mucosas.

Neste contexto, a partir da terapia comumente empregada - raspagem e alisamento radicular (RAR) - alguns patógenos subgengivais não são removidos por estarem localizados em regiões fora do alcance da RAR, como algumas lesões de furca e dentina radicular (Adriaens; Adriaens, 2004). Dessa forma, a busca de uma terapia periodontal mais eficaz é contínua, já que alguns pacientes ou sítios continuam a apresentar progressão de doença, mesmo após o tratamento convencional de RAR (Haffajee et al., 1997; Rosling et al., 2001, Ximénez-Fyvie et al., 2000a; Petersilka et al., 2002).

Haffajee et al. (2006) apresentaram a resposta a diferentes terapias do mesmo grupo de indivíduo que tiveram o perfil microbiológico analisado anteriormente por Teles et al. (2006). Como esperado, as respostas terapêuticas foram diferentes e dependentes da composição da microbiota subgengival. Por exemplo, o grupo de indivíduos que mostraram as maiores perdas de inserção pós-terapia possuía a microbiota dominada por *A. naeslundii* I e II. Os indivíduos com altos níveis de *E. nodatum* também apresentaram respostas clínicas insatisfatórias. Por outro lado, esses dois grupos demonstraram baixos níveis de complexo vermelho.

Em relação aos dados preliminares aqui apresentados, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os clusters na resposta terapêutica frente a nenhuma das duas terapias propostas.

É importante salientar que os estudos de associação de espécies microbianas com a doença periodontal representam apenas o primeiro passo no desenvolvimento de uma sequência de evidências necessárias para definir os patógenos periodontais. Os resultados deste estudo sugerem a importância de investigações adicionais com foco na virulência dos microrganismos, resposta do hospedeiro, fatores de risco, efeito da supressão/eliminação das espécies na progressão da doença. Além disso, estudos longitudinais sobre terapia periodontal, com a inclusão de um número maior de indivíduos em cada

um dos *clusters*, poderão fornecer informações valiosas em relação à resposta do hospedeiro frente às diversas combinações terapêuticas considerando a especificidade de seu perfil microbiológico.

6 CONCLUSÃO

* Existem diferenças no perfil de similaridade da microbiota subgengival de indivíduos com diagnóstico clínico de doença periodontal.

* Outros microrganismos, além dos patógenos clássicos do complexo vermelho, podem fazer parte da etiologia da doença periodontal.

* O perfil de similaridade não influenciou a resposta das duas terapias empregadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Fanas SH, Drucker DB, Hull PS. Amoxicillin with clavulanic acid and tetracycline in periodontal therapy. *J Dent*. 1991; 19:97-99.

Adriaens P, Edwards C, De Boever J, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentine of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol*. 1988; 59:493-503.

Adriaens PA, Adriaens LM. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol 2000*. 2004; 36:121-145.

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

Albandar JM, Olsen I, Gjermo P. Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs periodontitis. *Acta Odontol Scand*. 1990; 48:415-423.

American Academy of Periodontology, The. 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions. *Ann of Periodontol*. 1999; 4(1):38.

Araujo MBW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurements using a constant-force electronic probe: Analysis of inter-and intraexaminer variability. *J Periodontol*. 2003 Dec; 74(12):1736-1740.

Ávila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Specific primer for AP-PCR identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*. 1999 Nov; 26(11):699-704.

Baelun V, Fejerskov O, Manji F. Periodontal diseases in adult Kenyans. *J Clin Periodontol*. 1988; 15:445-452.

Booth V, Downes J, Van den Berg J, Wade WG. Gram-positive anaerobic bacilli in human periodontal disease. *J Periodontol Res* 2004; 39:213-220.

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; 31:1017-1076.

Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Goncalves C, Haffajee AD, Socransky SS *et al*. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population II - microbiological results. *J Clin Periodontol*. 2005;32: 406-11.

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

Christersson L, Wikesjö U, Albin B, Zambon J, Genco R. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. J Periodontol. 1987; 58:540-545.

Christersson LA, Christer LF, Dunford RG, Zambon JJ. Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. J Periodontol. 1992; 63:418-25.

Choi BK, Park SH, Yoo YJ et al. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. J Periodontol 2000; 71:1387-1394.

Ciancio SG, Slots J, Reynolds HS, Zambon JJ, McKenna JD. The effect of short-term administration of minocycline HCl on gingival inflammation and subgingival microflora. J Periodontol. 1982; 53:557-561.

Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombelli A. Amoxicillin and Metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of chronic periodontitis. J Periodontol. 2009; 80: 364-371.

Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombelli A. Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planing with or without amoxicillin/metronidazole in chronic periodontitis. J Periodontol. 2010;81(1):15-23.

Colombo A, Teles RP, Torres MC et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. J Periodontol 2002; 73:360-369.
Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol 1996; 1:926-932.

Crout RJ, Lee HM, Schroeder K, Crout H, Ramamurthy NS, Wiener M, Golub LM. The "cyclic" regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. J Periodontol. 1996; 67:506-514.

Dannewitz B, Pohl S, Eickholz P, Kim TS. Clinical and microbiological effects of a combined mechanic-antibiotic therapy in subjects with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. Am J Dent. 2007; 20(3):153-6.

Darout IA, Skaug N, Albandar JM. Subgingival microbiota levels and their associations with periodontal status at the sampled sites in an adult Sudanese population using miswak or toothbrush regularly. Acta Odontol Scand 2003; 61: 115-122.

Dastoor SF, Travan S, Neiva RF, Rayburn LA, Giannobile WV, Wang HL. Effects of adjunctive systemic azithromycin with periodontal surgery in the

treatment of chronic periodontitis in smokers: a pilot study. *J Periodontol.* 2007; 78(10):1887-96.

Dewhirst FE, Tamer MA, Ericson RE et al. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15:196-202.

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1988; 15:316-323.

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

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Bioch.* 1983; 132: 6-13.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Effect of systemically administered metronidazole on subgingival plaque composition. *J Dent Res.* 1999a; 78:542.

Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard K, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 1999b; 26:775-783.

Feres M, Haffajee AD, Gonçalves C, Allard K, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. *J Clin Periodontol.* 1999c; 26:784-792.

Feres M, Soares GM, Mendes JA, Silva MP, Faveri M, Teles R, Socransky SS, Figueiredo LC. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2012; 39(12):1149-58.

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

Freeman E, Ellen RP, Thompson G, Weinberg SE, Song M, Lazarus RH. Gingival crevicular fluid concentration and side effects of minocycline: a comparison of two dose regimens. *J Periodontol.* 1992; 63:13-18.

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

Gomes SG, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R. Periodontal status in smokers and never-smokers: Clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2006; 77(9):1483-1490.

Gomi K, Yashima A, Iino F, Kanazashi M, Nagano T, Shibukawa N, Ohshima T, Maeda N, Arai T. Drug concentration in inflamed periodontal tissues after systemically administered azithromycin. *J Periodontol.* 2007a; 78(5):918-23.

Gomi K, Yashima A, Nagano T, Kanazashi M, Maeda N, Arai T. Effects of full-mouth scaling and root planing in conjunction with systemically administered azithromycin. *J Periodontol.* 2007b; 78(3):422-9.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planning. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:767-776. (b)

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

Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effects of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000.* 2006; 42:219-258.

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; 31(11):996-1002.

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky, SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:324-34.

Haffajee AD, Socransky SS. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000.* 2006;42: 7-12.

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; 31:996-1002.

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

Haffajee AD, Torresyap G, Socransky SS. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *J Clin Periodontol.* 2007; 34:243-253.

Han B, Emingil G, Özdemir G, Tervahartiala T, Vural C, Atilla G, Baylas H, Sorsa T. Azithromycin as an adjunctive treatment of generalized severe chronic

periodontitis: clinical, microbiologic, and biochemical parameters. *J Periodontol.* 2012; 83(12):1480-91.

Hare R. New light on the Discovery of penicillin. *Med Leg J.* 1970; 38(2): 31-41

Hellden LB, Listgarten MA, Lindhe J. The effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1979; 6:222-230.

Helovuo H, Paunio K. Effects of penicillin and erythromycin on the clinical parameters of the periodontium. *J Periodontol.* 1989; 60:467-472.

Helovuo H, Hakkarainen k, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiology & Immunology.* 1993; 8:75-79.

Hinrichs JE, Wolff Lf, Pihlstrom BL, Schaffer EM, Liljemark WF, Bandt CL. Effects of scaling and root planning on subgingival microbial proportions standardized in terms of their naturally occurring distribution. *J Periodontol.* 1985; 56(4):187-94.

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

Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Predominant microbiota of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontal. Res.* 1995; 30(1):66-72.

Kaner D, Bernimoulin JP, Hopfenmüller W, Kleber BM, Friedmann A. Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol;* 2007a; 34(10):880-91.

Kaner D, Christan C, Dietrich T, Bernimoulin JP, Kleber BM, Friedmann A. Timing affects the clinical outcome of adjunctive systemic antibiotic therapy for generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2007b; (7):1201-8.

Kulik EM, Lenkeit K, Chenaux S, Meyer J. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(5): 1087-91.

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003; 82:38-344.

LaGier MJ, Threadgill DS. Identification of novel genes in the oral pathogen *Campylobacter rectus*. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(5):406-412.

Lindhe J, Liljenberg B, Adielson B, Borjesson I. Use of metronidazole as a probe in the study of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1983a; 10:100-112.

Lindhe J, Liljenberg B, Adielsson B. Effect of long-term tetracycline therapy on human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1983b; 10:590-601.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986; 13:431-445.

Löe H, Theilade E, Jensen, SB, Schiott CR. Experimental gingivitis in man. III. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontol Res.* 1967; 2(4):282-299.

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

Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Kerry GA, Higgins T, Stoll J. Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *J Periodontol.* 1984; 55:325-335.

Loesche WJ, Giordano JR, Soehren S, Hutchinson R, Rau CF, Walsh L, Schork MA. Nonsurgical treatment of patients with periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 81:533-543.

Loesche W, Kazor C. Microbiology and treatment of halitosis. *Periodontology* 2000, 2002; 28:256-79.

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

Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Caffessee R, Stoll J. Metronidazole therapy for periodontitis. *J Periodontal Res.* 1987; 22:224-226.

Loesche W. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J periodontal.* 1992; 63:1102-1109.

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

Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Morrison EC, Caffesse R, Hujoel PP. Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. *J Periodontol.* 1991; 62:247-257.

López NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004; 75: 717-725

López NJ, Gamonal JA, Martínez B. Repeated metronidazole and amoxicillin treatment of periodontitis. A follow-up study. *J Periodontol.* 2000; 71:79-89.

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

López NJ, Gamonal JA. Effects of metronidazole plus amoxicillin in progressive untreated adult periodontitis: Results of a single 1-week course after 2 and 4 months. *J Periodontol.* 1998; 69:1291-1298.

Lovdal A, Aron A, Waerhaugh J. Evidence of clinical manifestations of periodontal disease in light of oral hygiene and calculus formation. *J Am Dent Assoc.* 1958; 56:21-33.

Ludwig JA, Reynolds JF. *Statistical Ecology. A Primer on Methods and Computing.* New York: John Wiley & Sons, 1988:170.

Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res.* 1992; 71(7):1431-1438.

Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Hill R, Sohren S, Fenno JC *et al.* Clinical response of azithromycin as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in smokers. *J Periodont.* 2005; 76:426-36.

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; 35:885-96.

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; 19:379-385.

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; 39(10):955-61.

Moeintaghavi A, Talebi-ardakani MR, Haerian-ardakani A, Zandi H, Taghipour S, Fallahzadeh H, Pakzad A, Fahami N. Adjunctive effects of systemic amoxicillin and metronidazole with scaling and root planing: a randomized, placebo controlled clinical trial. *J Contemp Dent Pract.* 2007; 8(5):51-9.

Moore WEC, Moore LVH. The bacterial of periodontal disease. In *microbiology and Immunology of periodontal disease.* *Periodontol* 2000. 2000; 5:66:77.

Montgomery EH. Antibióticos Antibacterianos. In: Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. *Farmacologia e terapêutica para dentistas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 468-502.

Moore WEC. Microbiology of periodontal disease. J Periodont Res, 1987; 22: 335-41.

Muller HP, Lange DE, Muller RF. Concentrations of *A. actinomycetemcomitans* in subgingival plaque following short-term minocycline therapy. German. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift. 1990; 45:462-465.

Müller HP, Lange DE, Muller RF. A 2-year study of adjunctive minocycline-HCl in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. J Periodontol. 1993; 64:509-519.

Oteo A, Herrera D, Figuero E, O'Connor A, González I, Sanz M. Azithromycin as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of Porphyromonas gingivalis-associated periodontitis: a pilot study. J Clin. Periodontol. 2010; 37(11): 1005-1015.

Papapanou PN, Neiderud AM, Papadimitriou A, Sandros J, Dahlen G. "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. J Periodontol 2000; 71:885-897.

Pavicic MJAMP, van Winkelhoff AJ, Douqué NH, Steures RWR, Graaff J. Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. J Clin Periodontol. 1994; 21:107-112.

Pennel BM, Keagle JG. Predisposing factors in the etiology of chronic inflammatory periodontal disease. J Periodontol. 1977; 48(9):517-532.

Petersilka GM, Ehmke B, Flemmig TF. Anticicrobial effects of mechanical debridement. Periodontology 2000. 2002; 28:56-71.

Poulet PP, Duffaut D, Barthet P, Brumpt I. Concentrations and *in vivo* antibacterial activity of spiramycin and metronidazole in patients with periodontitis treated with high-dose metronidazole and the spiramycin/metronidazole combination. J Antimicrob Chemother. 2005; 55:347-351.

Rosenberg E, Evian CL, Listgarten MA. The composition of the subgingival microbiota after periodontal therapy. J Periodontol. 1981; 52:435-441.

Rosling B, Serino G, Hellstrom Mk, Socransky SS, Lindhe J. Longitudinal periodontal tissue alterations during supportive therapy: findings from subjects with normal and high susceptibility to periodontal disease. J Clin Periodontol. 2001 Mar; 28(3):241-249.

Russel AL. Epidemiology of periodontal disease. A review of the literature. Int Dent J. 1967; 17: 282-296.

Salari MH, Kadkhoda Z. Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis. *J Oral Sci* 2004; 46:157-161.

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; 38(9):838-46.

Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, DelleMijn-Kippuw N, Simon R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* 2000; 108:383-392.

Schei O, Waerhaugh J, Lovdal A, Aron A. Alveolar bone loss as related to oral hygiene and age. *J Periodontol*. 1959; 30:7-16.

Scopp IW, Froum SJ, Sullivan M, Kaz&jian G, Wank D, Fine A. Tetracycline: a clinical study to determine its effectiveness as long-term adjuvant. *J Periodontol*. 1980; 51:328-330.

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;83(10):1257-69.

Silva MP, Feres M, Siroto TA, Soares GM, Mendes JA, Faveri M, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2011; 38(9):828-37.

Slots J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res*. 1977; 85:114-21.

Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol*. 1979; 50:495-509.

Sneath PHA, Sokal RR. Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: WH Freeman & CO, 1973.

Socransky SS & Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38:35-87.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C., Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb; 25(2):134-144.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002; 28:12-55.

Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl.* 1994;(18):S684-5, 688-93; quiz S714-7.

Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol.* 1994b; 18:688-93.

Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1989; 4: 47-51.

Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2006; 42:180-218.

Thelaide E, Wright WH, Jensen SB, L oe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodont Res.* 1966; 1:1-13.

Van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Barendregt D, DelleMijn-Kippuw, Stijne A, van der Velden U. beta-Lactamase producing bacteria in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1997; 24(8):538-43.

Van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29:1023-1028.

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

Van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 2002; 29:1023-1028.

Van Winkelhoff, AJ, Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol 2000.* 2005; 39:40-52.

Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Diversity and morphology of members of the phylum "Synergistetes" in periodontal health and disease. *Appl Environ Microbiol.* 2009 [Epub ahead of print]

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

Winkel EG, van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA: Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2001; 28:296-305.

Watts T, Palmer R, Floyd P. Metronidazole: a double-blind trial in untreated human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1986; 13:939-943.

Walsh MM, Buchanan SA, Hoover CI, Newbrun E, Taggart EJ, Armitage GC, Robertson PB. Clinical and microbiologic effects of single-dose metronidazole or scaling and root planing in treatment of adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1986; 13:151-157.

Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Guggenheim B, Gobel UB. *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:745–752.

Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Guggenheim B, Gobel UB. *Treponema amylovorum* sp. nov., a saccharolytic spirochete of medium size isolated from an advanced human periodontal lesion. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:842–845.

Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Moter A, Guggenheim B, Gobel UB. *reponema lecithinolyticum* sp. nov., a small saccharolytic spirochaete with phospholipase A and C activities associated with periodontal diseases. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49:1329-1339.

Wyss C, Dewhirst FE, Gmur R et al. *Treponema parvum* sp. nov., a small, glucuronic or galacturonic acid-dependent oral spirochaete from lesions of human periodontitis and acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:955-962.

Wyss C, Moter A, Choi BK et al. *Treponema putidum* sp. nov., a medium-sized proteolytic spirochaete isolated from lesions of human periodontitis and acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54:1117-1122.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2000; 27(3):648-657.

Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruti E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2006; 33(12):869-877.

Zijnge V, Harmsen HJ, Kleinfelder JW, van der Rest ME, Degener JE, Welling GW. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to study bacterial community structure in pockets of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:59–65.