CEPPE
Centro de Pós-Graduação,
Pesquisa e Extensão

MESTRADO EM ODONTOLOGIA

ÀREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA

FERNANDA SAMPAIO RAMIRO

ANÁLISE QUANTITATIVA DOS NÍVEIS DE MICRORGANISMOS DO DOMÍNIO *ARCHAEA* PRESENTES NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE APÓS A TERAPIA PERIODONTAL

Guarulhos
2014

FERNANDA SAMPAIO RAMIRO

ANÁLISE QUANTITATIVA DOS NÍVEIS DE MICRORGANISMOS DO DOMÍNIO *Archaea* PRESENTES NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE APÓS A TERAPIA PERIODONTAL.

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos
para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de concentração: Periodontia
Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri
Co-Orientadora: Profa. Dra. Magda Feres

Guarulhos
2014

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas Fernando Gay da Fonseca

R173a

Ramiro, Fernanda Sampaio.
Análise quantitativa dos níveis de microrganismo do domínio Archaea presentes no biofilme subgengival de indivíduos com periodontia após a terapia periodontal / Fernanda Sampaio Ramiro. -- 2014.
54 f.; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Faveri

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2014.

1. Archaea 2. RNA Ribossômico 16S 3. Biodiversidade 4. Placa dentária 5.Periodontite Crônica I. Título II. Faveri, Marcelo de, (Orientador). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6

UnG
CEPPE
Centro de Pós-Graduação e Pesquisa

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "ANÁLISE QUANTITATIVA DOS NÍVEIS DE MICRORGANISMOS DO DOMÍNIO *ARCHAEA* PRESENTES NO BIOFILME SUBGENGIVAL DE INDIVÍDUOS COM PERIODONTITE CRÔNICA APÓS A TERAPIA PERIODONTAL" em sessão pública realizada em 31 de Março de 2014, considerou a candidata FERNANDA SAMPAIO RAMIRO aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Prof. Dr. Marcelo de Faveri (UnG)_____

2. Prof. Dr. Renato Correa Viana Casarin (UNIP)_____

3. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos (UnG)_____

Guarulhos, 31 de Março de 2014.

DEDICATÓRIA:

À minha família, Adelaide, Gilberto, Adriana, Eduardo e Gabriel.
Sem vocês não conseguiria nunca!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o criador e Dono de toda a ciência e sabedoria. Aos meus pais, Gilberto Ramiro e Adelaide M.S. Ramiro, por toda dedicação, amor paciência e incentivo e educação. A minha irmã Adriana S. Ramiro Sabadine, melhor amiga e companheira em todas as fases da minha vida e meu novo irmão Eduardo Sabadine. Amo vocês!

Meu tio Ethéocles de Paula Alves, minha tia Sônia Maria Sampaio e meus primos Ricardo de P. Alves, Debora Celetti Alves e Frederico de P. Alves, seus bons exemplos de vida me trouxeram esta imensa vontade de ser mestre.

Ao meu noivo Gabriel, por todo apoio, amor, carinho e cumplicidade e a sua família: Silvio Mandarino, Margarete Mandarino, Beatriz V. Mandarino, Livia V. Mandarino e Daniel Gonçalves que não mediram esforços para me ajudar, acolheram, aconselharam e até mesmo me permitiram horas a mais de descanso nos momentos de stress. Um agradecimento especial ao "tio" Fernando Mandarino, colega de profissão, pelos seus bons conselhos e exemplo de carreira acadêmica a ser seguido.

Ao professor Marcelo, meu orientador, agradeço pela confiança, pela paciência e pelo incentivo à pesquisa e ao aprendizado que me deu desde a minha graduação.

À todos professores , pela dedicação, pelos ensinamentos e por repartir conosco todos os seus conhecimentos. Obrigada professora Magda Feres e Luciene Figueiredo pelas palavras de encorajamento estando sempre presentes e a Izilvânia, pela amizade e aprendizado.

Aos meus amigos do mestrado e doutorado e graduação, Daiana Hernandes, Thiago Eduardo, Pedro Cabral ,Keise Távora , pela companhia nas aulas, nos congressos, no laboratório, na academia , pela troca de experiência e momentos de descontração e a Stela e sua família, amiga e companheira que esteve comigo diretamente me auxiliando no laboratório.

Agradecimento especial á Fundação de Amparo á pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela valiosa contribuição para o desenvolvimento desta pesquisa por meio do auxílio bolsa de mestrado e apoio financeiro.

Processo: 2011/16332-7

RESUMO

Há evidencias de uma possível relação entre *Archaea* e infecções orais, incluindo periodontites; porém até o presente momento nenhum estudo avaliou as alterações na prevalência e níveis de espécies de *Archaea* após o tratamento periodontal. O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações na prevalência e nos níveis de microrganismos do domínio *Archaea* presentes no ambiente subgengival de indivíduos com periodontite crônica submetidos a terapia de raspagem e alisamento radicular (RAR) isoladamente ou associada a antibióticos sistêmicos. Sessenta indivíduos com periodontite crônica generalizada foram aleatoriamente distribuídos em três grupos terapêuticos: Controle (n=20): RAR; Teste 1 (n=20): RAR + metronidazol (400mg) 3x/dia por 14 dias (MTZ); Teste 2 (n=20): RAR+MTZ + amxoxicilina (500mg) 3x/dia por 14 dias (AMX). Os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados: índice de placa, índice de sangramento gengival, profundidade de sondagem (PS), nível clínico de inserção, sangramento a sondagem e supuração. Além disso, 6 amostras de biofilme subgengival foram coletadas (3 com PS$\leq$3mm e 3 com PS$\geq$5mm) e analisadas por PCR quantitativo usando iniciadores universais para o domínio *Archaea*. As avaliações clínicas e microbiológicas foram realizadas no início do estudo e aos 180 dias pós-terapia. Os resultados demonstraram que todas as terapias reduziram significativamente todos os parâmetros clínicos avaliados, mas após 180 dias os indivíduos dos grupos MTZ e MTZ+AMX apresentaram maiores reduções de PS e ganho de inserção clínica quando comparados ao grupo RAR ($p<0,05$). Todos os grupos terapêuticos reduziram significativamente o número de indivíduos colonizados por *Archaea* aos 180 dias pós-terapia ($p<0,05$). Os grupos MTZ e MTZ+AMX apresentaram uma média significativamente menor de sítios colonizados e menores níveis destes microrganismos em sítios com PS$\geq$5mm aos 180 dias, quando comparados ao grupo RAR ($p<0,05$). Não foram observadas diferenças clínicas significativas em resposta ao tratamento periodontal em relação a presença ou ausência da colonização inicial de *Archaea*. Em conclusão, O uso de MTZ e MTZ+AMX associado a RAR proporcionou maior redução no número de sítios colonizados e nos níveis de Archaea em sítios com PS>5mm quando comparado a RAR isoladamente. O perfil de colonização de Archaea antes da terapia periodontal não influenciou as respostas clínicas no tratamento de indivíduos com periodontite crônica.

Palavras-chaves: *Archaea*. *16S rRNA*. Biodiversidade, biofilme subgengival, periodontite crônica, saúde periodontal.

ABSTRACT

There is evidence of a possible relationship between *Archaea* and oral infections, including periodontitis; however, to date no studies have evaluated the changes in the prevalence and levels of *Archaea* after periodontal treatment. The aim of this study was to evaluate changes in the prevalence and levels of microorganisms of the domain *Archaea* present in the subgingival biofilm of chronic periodontitis subjects treated with scaling and root planing (SRP) alone or in association with systemic antibiotics. Sixty subjects with chronic periodontitis were randomized into three treatment groups: control (n = 20): RAR, Test 1 (n = 20): RAR + metronidazole (400mg) 3x/day for 14 days (MTZ), Test 2 (n = 20): RAR + MTZ + amoxicillin (500 mg) 3x/day for 14 days (AMX). The following clinical parameters were evaluated: plaque index, gingival bleeding index, probing depth (PD), clinical attachment level, bleeding on probing and suppuration. In addition, 6 subgingival biofilm samples were collected (with PD<3 mm and 3 with PD>5mm) and analyzed by quantitative PCR using universal primers for the *Archaea* domain. Clinical and microbiological evaluations were performed at baseline and at 180 days post-therapy. The results showed that all therapies led to a statistically significant decrease in all evaluated clinical parameters, however, at 180 days post-therapy the MTZ and MTZ+AMX groups had a greater mean PD reduction and clinical attachment level compared with RAR ($p<0.05$). All treatment groups significantly reduced the number of individuals colonized by *Archaea* at 180 days post-therapy ($p<0.05$). The MTZ and MTZ + AMX group had a significantly lower mean sites colonized by *Archaea* and lower levels of these microorganisms at sites with PD$\geq$5 mm at 180 days compared to the RAR group ($p <0.05$). No clinical significant differences were observed in response to periodontal treatment in relation to the presence or absence of initial colonization of *Archaea*. In conclusion, the use of MTZ and MTZ + AMX associated with RAR provided the greatest reduction in the mean number of sites colonized by *Archaea* and its levels in sites with PD$\geq$5mm compared to SRP alone. The profile of colonization of *Archaea* before periodontal therapy did not influence the clinical responses in the treatment of subjects with chronic periodontitis.

KEY WORDS: *Archaea*, *16S rRNA*, Biodiversity, Subgingival biofilm, chronic periodontitis, periodontal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... **8**
1.2 Domínio Archaea..... **9**
1.3 Microbiologia das periodontites..... **11**
1.4 *Archaea* e o ambiente subgengival......... **13**
1.5 *Archaea* e o tratamento periodontal..... **17**
2. PROPOSIÇÃO..... **18**
3. MATERIAL E MÉTODOS..... **19**
3.1 Seleção da população..... **19**
3.2. Critérios de inclusão exclusão..... **19**
3.3 Delineamento do estudo..... **20**
3.3 Avaliação clínica..... **21**
3.5 Análise quantitativa de microrganismos dos domínios Archaea e Bactéria.... **24**
3.5.1 Quantificação do Domínio *Archaea*..... **25**
3.8 Análise estatística..... **26**
3.8.1. Análise Microbiológicas ……..... **26**
3.8.2. Análise Clínica ……..... **26**
4. RESULTADOS..... **27**
5.DISCUSSÃO..... **33**
6.CONCLUSÃO..... **38**
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……..... **39**

1.INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa que acomete as estruturas de proteção e sustentação dos dentes, levando a perda de inserção, de tecido ósseo, e eventualmente do elemento dentário. Observa-se uma progressão geralmente de lenta a moderada, indolor, com destruição tecidual compatível com os fatores locais presentes, e por uma maior prevalência em adultos (Armitage, 1999). A principal característica desta doença é ser causada por microrganismos específicos que colonizam os tecidos moles e duros da cavidade bucal e formam os biofilmes orais (Socransky e Haffajee, 1994; Socransky at al., 1998; Socransky e Haffajee, 2005).

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

A microbiota do homem é formada por organismos dos domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya* (Boyer et al. 2010), porém poucos estudos analisaram o domínio *Archaea*. Representantes do domínio *Archaea* foram recentemente associados à periodontite crônica (Kulik et al., 2001; Lepp et al., 2004; Yamabe et al. 2008), agressiva (Matarazzo et al, 2011) e as doenças peri-implantares (Faveri et al. 2011). *Archaea* são microrganismos procariontes distintos de bactérias, com diferentes

propriedades metabólicas, devido às características de organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia (Woese et al., 1990). Apesar deste domínio ter sido primeiramente isolado de ambientes com condições extremas, como elevada temperatura, alta salinidade e baixíssimos pHs, foi observada a sua ampla distribuição na natureza, inclusive sendo capazes de viver com eucariotos, em relações simbiontes. Na última década foi demonstrado que *Archaea* são capazes de colonizar e sobreviver em humanos em coexistência com a microbiota endógena (Cavicchioli et al. 2003; Eckburg et al. 2003, Faveri et al. 2011). Apesar da presença de *Archaea* na natureza e da íntima associação com humanos, nenhum organismo do domínio *Archaea* foi considerado patogênico até o presente momento (Yamabe et al., 2008). No entanto, a proporção de *Archaea* em relação aos domínios *Eucarya* e *Bacteria* pode exercer algum papel patogênico, visto que o potencial para formar relações simbióticas, mutualisticas ou patogênicas pode ser direcionado pelas oportunidades criadas através de interações estáveis e altamente densas (Cavicchioli et al., 2003; Eckburg et al., 2003) existente entre estes microrganismos e o ambiente.

1.1. Microbiologia das periodontites

Certos microrganismos presentes nos biofilmes orais têm sido relacionados com o início e progressão da periodontite (para revisão, ver Socransky e Haffajee, 2005). Porém, a simples presença dessas bactérias na cavidade bucal não determina que o indivíduo desenvolverá a doença. O equilíbrio ecológico entre a microbiota bucal e o hospedeiro na maioria das vezes é benigno e não oferece riscos para as estruturas de suporte dos dentes. Ocasionalmente, um grupo de bactérias pode proliferar ou exibir novas propriedades que levem a destruição do

periodonto. Sendo assim, pode-se considerar que a doença periodontal se desenvolve a partir de um desequilíbrio na interação entre hospedeiro e microrganismos patogênicos que possuam o potencial de colonizar os biofilmes da cavidade bucal (Socransky e Haffajee, 2005). O percentual de sítios colonizados por esses patógenos, os níveis dessas bactérias nos sítios colonizados, e a capacidade do organismo em combater os microrganismos agressores são condições fundamentais para o aparecimento de sinais clínicos de perda de inserção periodontal.

O caráter infeccioso específico das periodontites foi sugerido nas décadas de 1970 e 1980 (Listgarten e Helldén, 1978; Loesche, 1976; Löe et al., 1978,1986). Porém, dificuldades em se cultivar vários patógenos periodontais, principalmente as espécies anaeróbias estritas, como as espiroquetas, atrasaram os estudos microbiológicos de maior porte em periodontia. A partir do final da década de 1980, o desenvolvimento de técnicas imunológicas e de biologia molecular permitiu a detecção mais precisa das espécies bacterianas que compõem os biofilmes orais e começou-se então a estabelecer a relação dos diferentes perfis microbianos com as diversas formas de periodontite (Christersson et al., 1987; Socransky et al., 1988; Socransky e Haffajee, 1994; Ávila-Campos et al., 1999; Faveri et al., 2008, 2009). A maior vantagem dessas técnicas é a possibilidade de detecção de espécies difíceis de serem identificadas pelos métodos tradicionais de diagnóstico microbiológico, como a cultura bacteriana. Esse seria o caso de espécies como a *Tannerella forsythia* e as espiroquetas. Socransky et al. (1994) descreveram a técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para diagnóstico microbiológico, que utiliza sondas de ácido desoxirribonucléico (DNA) para identificação bacteriana. Esse mesmo grupo de pesquisadores utilizou essa técnica de diagnóstico para avaliar as

associações entre 40 espécies bacterianas presentes em 13.261 amostras de biofilme subgengival de 185 indivíduos (160 com periodontite e 25 saudáveis) (Socransky et al., 1998). Os autores descreveram cinco complexos bacterianos principais nas amostras de biofilme subgengival desses indivíduos. Um deles, denominado complexo vermelho, é composto pelas espécies *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, e foi fortemente relacionado com profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem (SS). Outro grupo, denominado complexo laranja, que precede a colonização pelo complexo vermelho, foi dividido em dois subgrupos: um central, composto por *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*; e outro grupo periférico, formado por *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracili* e *Streptococcus constellatus*. Os outros três complexos, denominados amarelo, verde e 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 *A. actinomycetencomitans* sorotipo b não se correlacionaram com outras espécies. Posteriormente, algumas espécies de *actinomicetos* (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces oris*) foram agrupadas e consideradas compatíveis com o

hospedeiro, relacionadas diretamente com estado de saúde (Socransky e Haffajee, 2002).

Existe uma forte evidência na literatura do papel do complexo vermelho e de algumas espécies do complexo laranja na etiologia e progressão das doenças periodontais. Esses microorganismos são encontrados com maior frequência e em níveis mais elevados em doença do que em saúde periodontal. Esses dados estão bem fundamentados na literatura por estudos que utilizaram PCR(Análise da cadeia Polimerase),(Ashimoto et al., 1996; Klein & Gonçalves, 2003), cultura (Haffajee & Socransky, 1994), *real-time* PCR (Kuboniwa et al., 2004) sondas de DNA (Albandar et al., 1997), técnicas imunológicas (Chaves et al., 2000; Di Murro et al., 1997; Gmur e Thurnheer 2002; Yang et al., 2004) e *Checkerboard DNA-DNA hybridization* (Socransky e Haffajee, 2005; Haffajee et al., 2005, Faveri et al. 2009). Alguns desses estudos demonstram ainda que os microrganismos do complexo vermelho estão em níveis extremamente baixos em indivíduos periodontalmente saudáveis (Ximenez-Fyvie et al., 2000; Li et al., 2004, Faveri et al. 2009). Uma outra informação interessante em indivíduos com periodontite, é que sítios rasos (<4mm) e sem sangramento mostram uma quantidade substancialmente maior de patógenos periodontais do que esses mesmos sítios rasos de indivíduos saudáveis (Socransky & Haffajee, 2005). A melhora clínica periodontal está diretamente relacionada à diminuição das espécies dos complexos laranja e, principalmente, vermelho, e a concomitante colonização por espécies benéficas dos complexos amarelo, roxo, verde e azul dos sítios tratados (Socransky et al., 2002). Por outro lado, a presença dessas espécies, ou a persistência delas após a terapia aumentam o risco a futura perda de inserção (Hamlet et al., 2004; Haffajee et al., 1995; Haffajee et al., 1996; Chaves et al., 2000)

1.2. Domínio *Archaea*

Atualmente existe a percepção do homem como um “supraorganismo”, compreendendo a soma de *Homo sapiens* e dos microrganismos que compõe a sua microbiota residente, formando uma estrutura metabólica que soma os atributos humanos e microbianos. Estes microrganismos pertencem aos três domínios de vida *Bacteria*, *Archaea e Eukarya* (Boyer et al. 2010). Assim, o conhecimento da microbiota é essencial para o conhecimento do próprio homem. Grandes esforços foram e estão sendo feitos, como o projeto internacional do microbioma humano, visando analisar a microbiota do intestino na saúde e doença (Turnbaugh et al., 2007, Devaraj et al. 2013). Outras superfícies do corpo humano, particularmente as superfícies mucosas como a cavidade bucal, são também densamente colonizadas e devem ser analisadas com maior magnitude.

Archaea é a designação de um dos domínios de seres vivos, relacionados com as bactérias. Trata-se de organismos procariotos, geralmente denominados extremofílicos, ou seja, microrganismos que não apenas toleram, mas se desenvolvem em ambientes normalmente considerados inapropriados para a vida, tais como fontes de água muito salina, pântanos (onde produzem metano), ambientes ricos em gás sulfídrico e com altas ou baixas temperaturas (Boyer et al. 2010). Foram primeiramente isolados na década de 70 (McConnell et al. 1978) e são microrganismos semelhantes às bactérias em muitos aspectos da estrutura celular, tais como ausência de um núcleo celular diferenciado e algumas características do metabolismo, entretanto também apresentam algumas diferenças e por isso são considerados um outro domínio da vida.

A Tabela 1 apresenta algumas diferenças existentes entre os domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (Wrede et al. 2012).

Tabela 1. Principais diferenças existentes entre os três domínios da vida.

Características	*Bacteria*	*Archaea*	*Eukarya*
Parede celular	Peptideoglicano	Pseudo-peptideoglicano, glicoproteínas e outros	Celulose em plantas, quitina em fungos e nenhuma em animais
Membrana nuclear	Ausente	Ausente	Presente
Número de cromossomos	1	1	>1
Mureína na parede celular	Presente	Ausente	Ausente
Lipídeos da membrana celular	Glicerídeos ligados a éster, não ramificados; saturado ou mono-insaturado	Isoprenóide; glicerol diéter ou di-glicerol tetra éter	Glicerídeos ligados a éster; não ramificados; poli-insaturados
Organelas (mitocôndria)	Ausente	Ausente	Presente
Ribossomo	70S	70S	80S

Os microrganismos do domínio *Archaea* podem ser classificados em relação a sua fisiologia em: metanogênicos (anaeróbios estritos que produzem metano), halófilos (aeróbios que vivem em meio com alta concentração de sal) e os termoacidófilos (aeróbios que vivem em meio ácido) (Matarazzo et al. 2012). Além disso, o domínio *Archaea* é composto por 4 filos, sendo o filo *Euryarchaeota* o mais comumente encontrado nos seres humanos. Os ecossistemas humanos mais estudados quanto à presença de *Archaea* e a sua relação com doenças são os do trato intestinal (Scanlan et al., 2008; Dridi et al., 2009) e o ambiente subgengival (Kulik et al., 2001; Lepp et al, 2004; Yamabe et al., 2008; Li et al., 2009; Vianna et al., 2009, Faveri et al. 2011, Matarazzo et al. 2011, Matarazzo et al. 2012).

1.3. *Archaea* e o ambiente subgengival

Em relação a presença de *Archaea* e os seres humanos, estes microrganismos foram identificados na microbiota intestinal (Scanlan et al., 2008), oral (Kulik et al, 2001; Leep et al. 2004; Vianna et al. 2008; Yamabe et al., 2008, Faveri et al. 2011) e vaginal (Belay et al., 1990, Eckburg et al., 2003), sendo as espécies metanogênicas as mais comumente encontradas. O interesse nas populações metanogênicas da cavidade bucal está embasado na possível associação destes com a produção de metano (apresentam a propriedade de consumir o hidrogênio e o dióxido de carbono, para a produção de metano) e a ocorrência de halitose, doença periodontal e infecção endodôntica (Kulik et al., 2001; Robichaux et al., 2003; Lepp et al., 2004; Vianna et al., 2006; Vickerman et al., 2007; Yamabe et al. 2008). Dentre as espécies metanogênicas, pertencentes ao filo *Euryarchaeota,* os membros do gênero *Methanobrevibacter* são os mais frequentemente encontrados na cavidade bucal, sendo o *Methanobrevibacter oralis* a espécie de *Archaea* mais predominante neste ambiente (Kulik et al., 2001; Lepp et al., 2004; Vianna et al., 2006; Vickerman et al., 2007; Yamabe et al. 2008).

Por meio da utilização da técnica de PCR, a presença de microrganismos do domínio *Archaea* em amostras com infecção endodôntica foi investigada em 96 canais radiculares por Siqueira et al. (2005). Os autores selecionaram amostras de canais radiculares tratados e não tratados de indivíduos com lesão endodôntica crônica ou com abscesso agudo. Desta forma, o domínio *Bacteria* foi investigado e detectado em todas as amostras, entretanto o domínio *Archaea* não foi detectado em nenhuma amostra. Todavia, contrariando estes resultados, estes microrganismos foram detectados em sítios endodônticos por outros grupos de

pesquisa (Vianna et al., 2006; Vickerman et al., 2007). Vinte dentes com características clínicas de necrose pulpar foram examinados para a presença de metanogênicos (Vianna et al., 2006). Ensaios de PCR quantitativo foram usados para amplificar o gene *mcrA* que codifica a enzima envolvida na metanogênese distinguindo os metanogênicos, e o gene *16S rRNA* de *Archaea*. Cinco das 20 amostras apresentaram metanogênicos pertencentes ao gênero *Methanobrevibacter*. A quantidade total de *Archaea* variou, e atingiu 2,5% da população procarionte. Corroborando com estes resultados, a presença de *Archaea* relacionados ao gênero *Methanobrevibacter* em canais radiculares foi confirmada por Vickerman et al. (2007) que detectaram estes microrganismos em 2 das 34 amostras analisadas.

Brusa et al. (1987) foram os primeiros a detectar a presença de microganismos metanogênicos no biofilme subgengival em seres humanos. Logo em seguida, Belay et al. (1988 analisaram 54 amostras de 36 indivíduos, sendo que 20 amostras foram positivas para *Archaea* que haviam sido obtidas de 9 indivíduos com alguma doença periodontal. Após a detecção destes microrganismos no ambiente subgengival, estudos buscando estabelecer a relação destes microrganismos com as infecções periodontais se deu início. Na periodontite crônica alguns estudos observaram a presença de *Archaea* em amostras de biofilme subgengival e procuraram estabelecer uma relação entre a presença destes microrganismos com a etiologia da infecção. Kulik et al. (2001) detectaram *rRNA* de *Archaea* em 77% das amostras de biofilme subgengival coletada de pacientes com gengivite e periodontite. Estes resultados foram corroborados por Li et al. (2009), que relataram uma prevalência de 73,2% de *Archaea* no ambiente subgengival de indivíduos com periodontite crônica. Lepp et al. (2004) avaliaram amostras de biofilme subgengival

de pacientes saudáveis e com periodontite crônica e não foram detectados membros do domínio *Archaea* em nenhuma das amostras dos indivíduos periodontalmente saudáveis, entretanto 36% dos indivíduos com doença periodontal albergavam estes microrganismos. Li et al. (2008) analisaram amostras de biofilme subgengival de 23 indivíduos com periodontite agressiva, 29 com periodontite crônica, 35 com gengivite e 38 indivíduos com saúde periodontal, e os autores relataram uma prevalência de 65%, 72%, 26% e 0%, respectivamente. Recentemente, Matarazzo et al. (2012) analisaram a prevalência e os níveis de microrganismos do domínio *Archaea* em amostras de biofilme subgengival de 30 indivíduos com periodontite agressiva generalizada e 30 indivíduos com saúde periodontal. Quatro amostras de biofilme subgengival dos indivíduos com periodontite agressiva (2 com profundidade de sondagem ≤ 3 mm e 2 com profundidade de sondagem ≥ 5mm) e duas amostras de biofilme subgengival dos indivíduos com saúde periodontal foram analisados por PCR quantitativo. Apenas um indivíduo com periodontite agressiva generalizada e quatro indivíduos do grupo com saúde periodontal foram negativos para *Archaea* nos ensaios de PCR em tempo real. O nível médio de *Archaea* nos indivíduos com saúde periodontal foi de $0,5 \times 10^4 \pm 0,2$ e nos indivíduos com periodontite agressiva generalizada de $11,2 \times 10^4 \pm 6,6$ ($p<0,05$), com diferença estatisticamente significante entre os grupos. Ashok et al. (2013) não observaram diferenças significativas na prevalência de *Archaea* entre indivíduos com saúde periodontal e periodontite crônica. Os autores relataram uma prevalência de *Archaea* em 29,4% e 11,8 % dentre 34 indivíduos com periodontite crônica e 16 indivíduos com saúde periodontal, respectivamente. Todavia, quando os sítios foram categorizados em sítios rasos [profundidade de sondagem (PS) <3mm] ou sítios profundos (PS>5mm), os autores observaram um aumento significativo no aumento da prevalência destes

microrganismos nos sítios profundos (47,1% versus 12,5%). Bringuier *et al.* (2013) também não observaram diferenças significativas em relação a prevalência de *M. oralis* entre indivíduos com saúde periodontal quando comparados a indivíduos com periodontite crônica. Encontravam-se colonizados por este microrganismo 3 dos 10 com saúde periodontal e 12 dos 22 indivíduos e periodontite crônica, respectivamente. Entretanto, os autores relataram uma correlação entre a quantidade de *M. oralis* e a severidade da doença periodontal. Desta forma, a conclusão destes estudos sugerem que microrganismos do domínio *Archaea*, especialmente o *Methanobrevibacter oralis*, podem estar implicados na etiologia das doenças periodontais.

Sugere-se que *Archaea* sejam necessárias e fundamentais em certos nichos anaeróbicos para manter um equilíbrio bioquímico desejável no microambiente (Vianna *et al.*, 2006). Por exemplo, a ausência relativa de oxidantes de metano comparado com o número de bactérias redutoras de sulfato na microbiota intestinal humana com o resultante aumento de sulfeto de hidrogênio poderia contribuir para o desenvolvimento de doença(como os estudos mostraram?) (Scanlan et al., 2008). Por outro lado, alguns estudos tentam vincular a presença de metanogênicos e o desenvolvimento de doenças de causa ainda desconhecida (Kulik et al., 2001; Cavichiolli et al., 2003; Eckburg et al., 2003; Lepp et al., 2004; Vianna et al., 2006; Yamabe et al., 2008). Como estas doenças representam um processo dinâmico no qual várias espécies microbianas dominam em diferentes fases da infecção devido às mudanças na disponibilidade nutricional, nível de oxigênio e pH local, os estudos sugerem que os *Archaea* metanogênicos indiretamente poderiam promover a doença pelo consumo de hidrogênio, assim permitindo a proliferação de fermentadores secundários para níveis superiores ao limite possível na sua ausência

(Lepp *et al.*, 2004; Scanlan et al., 2008). Assim, embora microrganismos do domínio *Archaea* tenham sido detectados em amostras de biofilme subgengival de indivíduos com periodontite (Kulik *et al.*, 2001; Lepp *et al.*, 2004; Yamabe et al., 2008) e tenha sido demonstrada resposta de anticorpos contra *M. oralis* em indivíduos com periodontite (Yamabe et al., 2008), os estudos ainda são contraditórios quanto à associação entre este domínio e o desenvolvimento da doença periodontal (Kulik et al., 2001; Lepp et al., 2004; Yamabe et al., 2008) e a influencia dos níveis destes microrganismos em varias condições periodontais deve ser ainda melhor estudado.

1.4. *Archaea* e o tratamento periodontal

Vários são os critérios que devem ser seguidos para realmente vincular determinados microrganismos com a etiologia e progressão de determinada infecção. Os postulados de Kock (1882) e os postulados de Evans (1976) fundamentam vários destes critérios. Dentre alguns destes critérios, um refere-se que “a eliminação ou modificação da prevalência do agente infectante deve diminuir a incidência e a progressão da doença”. Neste interim, poucos foram os estudos que observaram as alterações nos níveis e prevalência de *Archaea* frente a terapia periodontal. Lepp et al. (2004) descreveu a redução da proporção de *Archaea* no ambiente subgengival de 6 indivíduos com periodontite crônica submetidos a terapia de raspagem e alisamento radicular aos 18 meses pós-tratamento. Recentemente, Lira et al. (2013) realizou um estudo clínico no qual avaliou a alteração na prevalência de *Archaea* em 30 indivíduos com periodontite agressiva generalizada submetidos a terapia de raspagem e alisamento radicular isoladamente ou associada ao uso sistêmico de metronidazol e amoxicilina. Os autores observaram

uma redução significativa no número de indivíduos e sítios colonizados por este domínio aos 6 meses pós-terapia, entretanto sem diferenças significativas entre os grupos terapêuticos. Os autores concluiram que a RAR isoladamente ou associada ao uso de metronidazol e amoxicilina apresentaram resultados similares na redução da prevalência de *Archaea* no ambiente subgengival de indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Além disso, sugerem que mais estudos, avaliando as alterações nos níveis destes microrganismos devem ser realizados para uma melhor compreensão do verdadeiro papel deste Domínio na etiologia das periodontites.

2. PROPOSIÇÃO

Avaliar as alterações na prevalência e nos níveis de microrganismos do domínio *Archaea* presentes no ambiente subgengival de indivíduos com periodontite crônica submetidos a terapia de raspagem e alisamento radicular isoladamente ou associada a antibióticos sistêmicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção da população

Após a apreciação e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos, amostras de biofilme subgengival de 60 indivíduos portadores de periodontite crônica foram analisados. Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo, seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e forma de coleta de amostras. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, responderam a um questionário de saúde/anamnese e quando necessário receberam a terapia periodontal gratuitamente, estando de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução n° 466/12).

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

*3.2.1.*Periodontite crônica (PC)

Os indivíduos foram selecionados segundo alguns critérios propostos pela Academia Americana de Periodontia (AAP) (Armitage, 1999):

- Idade superior ou igual a 35 anos;
- Possuir no mínimo 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares;
- Mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal apresentando PS e nível clínico de inserção (NCI) > 5mm em dentes não contíguos.
- Mínimo de 30% dos sítios periodontais apresentando PS e NCI > 4mm e sangramento a sondagem

3.2.2.Critérios de exclusão

- Fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos.
- Gestantes ou lactantes;
- Histórico de tratamento periodontal prévio;
- Histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- Uso prolongado de medicação anti-inflamatória;
- Histórico de uso de antissépticos orais nos últimos seis meses;
- Doença sistêmica que comprometesse a resposta do hospedeiro ou exigisse medicação profilática ao tratamento, como prótese de válvulas cardíacas;
- Relato de alergia ao MTZ e/ou à penicilina.

3.3. Delineamento do estudo

Os indivíduos selecionados para participar deste estudo duplo-cego, randomizado e placebo controlado foram aleatoriamente distribuídos, por meio de uma tabela de números equiprováveis em 3 grupos terapêuticos. Cada grupo apresentou 20 indivíduos, sendo um grupo controle e dois grupos testes. Os indivíduos foram distribuídos nos seguintes tratamentos:

3.3.1.Controle (C): Raspagem e alisamento radicular associado ao metronidazol placebo e amoxicilina placebo;

3.3.2.Teste 1: Raspagem e alisamento radicular associado ao metronidazol (400mg, 3x/dia durante 14 dias) e amoxicilina placebo;

3.3.4.Teste 2: Raspagem e alisamento radicular associado à amoxicilina (500mg, 3x/dia durante 14 dias) e metronidazol (400mg, 3xdia durante 14 dias).

Inicialmente, todos os pacientes receberam monitoramento clínico e microbiológico, de acordo com o protocolo especificado nas duas sessões seguintes, seguido de raspagem supragengival (RSP) de todos os dentes e instrução de higiene oral. Todos os voluntários foram orientados a utilizar o mesmo dentifrício contendo triclosan/gantrez (Colgate Total®, Anakol Ind. Com. Ltda- Kolynos do Brasil - Colgate Palmolive Co, São Bernardo do Campo, SP, Brazil). A terapia básica de raspagem (RAR) foi realizada de 4 a 6 sessões e finalizada, no máximo, em 14 dias. Os pacientes foram orientados a iniciar o uso da antibioticoterapia e/ou placebo ao mesmo tempo do início da terapia de raspagem, seguindo este tratamento por 14 dias. Os pacientes foram monitorados clínica e microbiologicamente no início do estudo e 180 dias pós-terapia.

Devido à característica duplo-cego do estudo os profissionais responsáveis pelo tratamento e os indivíduos participantes não tinham conhecimento sobre a terapia periodontal recebida. Além disto, o profissional que realizara os exames clínicos e microbiológicos não foi o mesmo que realizou os procedimentos terapêuticos.

3.4. Avaliação clínica

O exame clínico-periodontal foi efetuado no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico periodontal. Dois examinadores/terapeutas (G.M.S.S e J.A.V.M.) participaram de um exercício de calibração com o objetivo de

conseguir a máxima reprodutibilidade nas medições realizadas por cada um deles e entre eles, e o erro médio padrão para os parâmetros clínicos (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção) foi calculado. A variabilidade inter-examinador foi 0,23 mm para PS e 0,25 mm para NCI. A média de variabilidade intra-examinador foi 0,19 mm para PS e 0,24 mm para NCI para o examinador 1 (G.M.S.S) e 0,21mm para PS e 0,26 mm para NCI para o segundo examinador (J.A.V.M.). Para as variáveis categóricas a média do nível de concordância para cada examinador e entre eles foi superior a 92% (Teste Kappa). Em cada indivíduo participante, um examinador realizava todas as avaliações clínicas e o outro examinador realizava todo o tratamento.

As mensurações clínicas foram realizadas no início do estudo, e aos 180 dias pós-terapia para os grupos submetidos à terapia periodontal. Foram examinados 6 sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual, distolingual), em todos os dentes presentes (exceto terceiros molares) utilizando-se sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15 HuFriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os parâmetros clínicos avaliados incluíram:

- Índice de Placa Visível - (IPV) (AINAMO e BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de placa supragengival visível;
- Índice de Sangramento Gengival - (ISG) (AINAMO e BAY, 1975): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento da gengiva marginal, após percorrer levemente a sonda periodontal ao longo do sulco gengival;
- Profundidade de Sondagem - (PS): distância, em milímetros, entre a margem gengival livre e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;

- Nível Clínico de Inserção - (NCI): distância, em milímetros, entre a junção cemento-esmalte e a porção mais apical sondável do sulco/bolsa periodontal;
- Sangramento à Sondagem - (SS): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento, após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada;
- Supuração - (SUP): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de SUP espontânea ou após 20 segundos da sondagem com a sonda periodontal milimetrada.

3.5. Procedimentos terapêuticos

3.5.1. Terapia periodontal básica

Após o exame clínico e coleta de placa dentária subgengival para análise microbiológica, os indivíduos foram submetidos à RSP da boca toda e instruções de higiene oral (IHO). Em seguida, receberam 4 a 6 sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hu-Friedy, Chicago, EUA), sob anestesia local com BioPressin® - cloridrato de prilocaína a 3%, felipressina 0,03UI (Unidades Internacionais), (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Estas sessões de RAR tiveram uma duração de aproximadamente 1 hora e foram realizadas em 14 dias. O tratamento periodontal recebido foi gratuito. As outras necessidades de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da Clínica de Graduação da Universidade Guarulhos.

3.5.2. Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos

Voluntários dos grupos testes (MTZ e MTZ+AMX) receberam RAR e administração de 1,2 g/dia de MTZ (400mg de 8/8 horas) somente, ou combinado com 1,5 g/dia de AMX (500mg de 8/8 horas) via oral por 14 dias, iniciada em conjunto com a terapia periodontal básica. Os voluntários dos grupos controle e dos grupos das terapias que utilizaram placebo de uma das drogas ou de ambas, receberam comprimidos de placebo e foram orientados a seguir o mesmo regime dos voluntários que receberam as substâncias ativas. O antibiótico e o placebo foram manipulados especialmente para este estudo na Farmácia de Manipulação Pharmédica (São Paulo, SP, Brasil). Todas as cápsulas (medicação ou placebo) apresentaram a mesma coloração e tamanho, e foram estocados em frascos plásticos leitosos com 21 unidades, devidamente codificados. Quanto ao controle da ingestão da droga nos intervalos pré-determinados, os voluntários foram orientados a retornar na semana seguinte à clínica de Odontologia-UnG, trazendo o frasco vazio para depois receber outro frasco contendo a mesma medicação. Além disso, também foram monitorados de 4 em 4 dias, pessoalmente ou via telefone, por um aluno de iniciação científica.

3.5.3. Seleções dos sítios testes

Foram selecionados 6 amostras de biofilme subgengival de cada indivíduo, distribuídos uniformemente de acordo com a PS inicial nas seguintes categorias de bolsa (3 sítios por categoria): rasas (PS≤ 3mm) e profundas (PS≥ 5mm). Estes sítios estavam localizados nas faces dentais interproximais não-contíguas, e

preferencialmente distribuídos entre os 4 quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados. Amostras de biofilme subgengival foram coletadas no início e 180 dias pós-terapia.

3.5.4. Coleta das amostras de biofilme subgengival

Após a remoção da placa supragengival a coleta de amostras de biofilme subgengival foi realizada com curetas Gracey do tipo mini-five (HuFriedy, USA), posicionadas na porção mais apical dos sítios selecionados. As amostras foram depositadas em tubos plásticos individuais (eppendorf) contendo 100 μl de solução TE (10 mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, pH 7,6). O tubo foi imediatamente armazenado para posterior extração de DNA e análise por PCR quantitativo. Estes tubos foram identificados e armazenados à -80°C até o seu processamento.

3.6. Análise quantitativa de microrganismos dos domínios *Archaea*:

3.6.1.Extração de DNA:

O DNA das amostras foi extraído utilizado o kit Epicentre Masterpure DNA & RNA Purification (Epicentre, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O tubo contendo a amostra foi retirado do freezer -80°C e mantido em gelo por 10 minutos para descongelamento. O tubo foi agitado no vortex por 1 minuto e a solução foi transferida para um novo tubo. Para a lise do material coletado, adicionou-se 1,0μL de solução de proteinase K (50μg/μL) aos 100μL da solução de TE da amostra, e posteriormente incubado a 65°C, por 15 minutos. As

amostras foram mantidas em gelo por 5 minutos, foi adicionado 175µL do reagente para precipitação de proteínas MCP, centrifugação por 10 minutos a 12°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 500 µL de isopropanol, os tubos foram agitados por 2 minutos e após isso ocorreu nova centrifugação por 10 minutos a 4°C. O isopropanol foi descartado e os *pellets* (precipitados de DNA) foram lavados duas vezes com etanol 70%. Os *pellets* foram secos por 10 minutos e após ressuspensos em 25 µL TE e armazenado à -80°C.

3.7. Análise quantitativa de microrganismos dos domínios *Archaea*

A prevalência e a quantificação de *Archaea* nas amostras de biofilme subgengival foram estimadas em ensaios de PCR em tempo real. Amostras de biofilme gengival obtidas de 3 sítios profundos (PS ≥ 5mm) e 3 sítios rasos (PS ≤ 3mm) por indivíduo no inicio do estudo e aos 180 dias pós-terapia foram selecionadas para esta análise.

3.7.1. Quantificação do Domínio *Archaea*

3.7.1.1.Obtenção da curva padrão:

Para obtenção da curva padrão, utilizada como parâmetro na quantificação das amostras, foram utilizadas diluições sucessivas da concentração de DNA da espécie de *Archaea Halobacterium* (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/13516*).

A quantificação da concentração de DNA presente nos controles foi baseada no tamanho do genoma da espécie e o peso médio de um par de nucleotídeos (Dolezel

et al. 2003). Assim sendo, a solução de DNA gnômico da espécie *Halobacterium* foi diluída obtendo-se aproximadamente 10^{10} células/µL, a partir da qual foram realizadas diluições em série, variando de 10^1 a 10^6 células, e estas utilizadas como DNA molde em PCR em tempo real para a montagem da curva padrão, que foi realizada em triplicata.

3.7.1.2.Condições Gerais para PCR quantitativo:

As reações de PCR quantitativo (qPCR) foram realizadas com o sistema LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando o kit FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Todas as reações foram processadas utilizando os iniciadores universais para *Archaea*, 931f (5´-AGGAATTGGCGGGGGAGCA-3´) e m1100r (5´-BGGGTCTCGCTCGTTRCC), cuja sensibilidade e especificidade foram demonstradas por Einen et al. (2008) e resultam em um produto de 195 pb. Para a reação de amplificação foi utilizando 0,5 µM de cada iniciador (Einen et al. 2008), 50-75 ng de DNA molde por amostra para um volume final de 20 µL por reação. As condições das reações foram determinadas seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, sendo uma pré-incubação a 95 ºC por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 ºC por 10s, anelamento a 60 ºC por 8s e extensão a 72 °C por 7s. Para cada uma das análises, água foi utilizada como controle negativo e DNA molde (10^5 cópias do gene *16S rRNA*) de *Archaea* como controle positivo para a curva padrão. O produto das reações foi quantificado utilizando o programa do próprio fabricante (LightCycler Quantification Software - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Após a reação foi

realizada a curva de dissociação para verificar a especificidade dos amplicons conforme as normas sugeridas pelo fabricante do sistema LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

3.8 Análise estatística

3.8.1. Análise Clínica

A média das medidas clínicas de PS e NCI, assim como a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração, PS$\geq$ 5mm foram computados para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. As diferenças dentro de cada grupo, entre os tempos experimentais foram avaliadas utilizando o teste t de Student para amostras pareadas. Análise de variância ANCOVA ajustado para os dados do inicio do estudo foi utilizado para examinar diferenças entre os 2 grupos terapêuticos aos 180 dias pós-terapia.

A significância estatística foi estabelecida em 5%.

3.8.2. Análise Microbiológica:

Diferenças significantes entre a prevalência de indivíduos colonizados ou não por *Archaea* no início do estudo e aos 180 dias pós-terapia foram analisada pelo teste Qui-quadrado. O percentual de sítios colonizados por *Archaea* foi computado para cada sítio e depois calculada as médias entre os sítios para cada indivíduo e então entre os indivíduos de um mesmo grupo terapêutico em cada tempo

experimental. Os níveis médios de *Archaea* foram expressos como Log10 da contagem $x10^5$ em cada sítio, posteriormente foram calculadas as médias de cada indivíduo e então entre os indivíduos dentro de cada grupo nos diferentes tempos experimentais. Diferenças significantes no percentual de sítios colonizados e nos níveis médios de *Archaea* em ambos os tempos experimentais foram analisadas pelo teste de variância ANCOVA ajustado para os dados do início do estudo. Diferenças significantes entre o início do estudo e 180 dias pós-terapia foram avaliadas pelo teste t-Student para amostras pareadas. A significância estatística será estabelecida em 5%.

4.RESULTADOS

4.1. Resultados clínicos

A Tabela 2 apresenta as características demográficas e os parâmetros clínicos para os 3 grupos terapêuticos, no início do estudo e aos 180 dias pós-terapia. Um indivíduo do grupo MTZ+AMX faltou na consulta de avaliação de 180 dias e desta forma foi excluído das análises clínicas e microbiológicas. Nenhum dos parâmetros diferiu significativamente entre os dois grupos no início do estudo. Aos 180 dias pós-terapia, embora as melhoras clínicas tenham ocorrido para todos os grupos terapêuticos, observa-se que o grupo que utilizou MTZ ou a combinação de MTZ+AMX apresentou melhoras clínicas mais evidentes que o grupo que recebeu apensa a RAR. Ambos os grupos MTZ e MTZ + AMX apresentaram uma média de PS estatisticamente significante inferior ao grupo que recebeu apenas RAR ($p<0,001$), entretanto sem diferenças significativas entre eles.

A tabela 3 apresenta o número de sítios com profundidade de sondagem ≥ 5mm no início do estudo e aos 180 dias após o início da terapia, bem como a alteração no número destes sítios entre os tempos experimentais. A média de sítios residuais aos 180 dias foi de 15,8 ± 13,2 para o grupo de RAR, 7.0 ± 6.8 para o grupo que recebeu apenas o MTZ e de 5.1 ± 5.0 para o grupo que recebeu terapias combinadas (RAR+MTZ+AMX) ($p<0,05$). Ambos os grupos teste, MTZ e MTZ+AMX apresentaram uma redução significativa no número de sítios residuais quando comparados ao grupo controle, entretanto sem diferenças significativas entre eles.

Tabela 2. Média (± DP) dos parâmetros clínicos, no exame inicial e 180 dias pós terapia para os indivíduos nos 3 grupos terapêuticos.

Variáveis	Tempo	Grupos de tratamento			ANCOVA p-valor
		RAR n=20	RAR+MTZ n=20	RAR+MTZ+AMX n=19	
Idade	Início	45,3 ± 8,7	46,1 ± 8,4	46,8 ± 8,7	
Gênero*	Início	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,3 ± 0,4	0.714
PS	Início	3,7 ± 0,5 [a]	3,6 ± 0,4 [a]	3,8 ± 0,4 [a]	
	180 dias	3,0 ± 0,5 [b, A]	2,6 ± 0,3 [b,B]	2,6 ± 0,2 [b,B]	**0.001**
NCI	Início	4,3 ± 0,7 [a]	4,0 ± 0,7 [a]	4,3 ± 0,6 [a]	
	180 dias	3,7 ± 0,8 [b]	3,2 ± 0,6 [b]	3,4 ± 0,6 [b]	0.068
% de sítios com					
IP	Início	81,2 ± 13,9 [a]	81,8 ± 14,4 [a]	78,6 ± 15,2 [a]	
	180 dias	40,8 ± 27,8 [b]	32,3 ± 22,1 [b]	39,2 ± 27,4 [b]	0.560
IG	Início	37,1 ± 25,8 [a]	37,6 ± 21,4 [a]	40,2 ± 28,2 [a]	
	180 dias	18,4 ± 21,4 [b]	14,6 ± 18,9 [b]	16,1 ± 19,9 [b]	0.836
SS	Início	72,0 ± 21,4 [a]	76,0 ± 13,9 [a]	72,5 ± 16,7 [a]	
	180 dias	25,8 ± 28,9 [b]	21,3 ± 28,2 [b]	21,7 ± 30,8 [b]	0.868
Sup	Início	0,9 ± 3,2 [a]	0,3 ± 0,6 [a]	4,2 ± 7,3 [a]	
	180 dias	0,2 ± 0,5 [b]	0,3 ± 1,1 [b]	0 ± 0 [b]	0.489

As diferenças significantes entre o início e 180 dias pós-terapia foram testadas pelo teste t-Student para amostras pareadas (letras maiúsculas indicam as diferenças existentes entre os tempos experimentais $p<0,05$). As diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos experimentais foram testadas pela análise de variância ANCOVA (ajustado para os dados do início do estudo). Diferenças na distribuição do gênero entre os grupos foi testada pelo teste Qui-quadrado (*)

RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; PS, profundidade de sondagem; NCI, nível clinico de inserção; IP, índice de placa; IG, índice gengival; SS, sangramento a sondagem; Sup, supuração; DP, desvio padrão.

Tabela 3. Média ±DP do número de sítios com PS ≥ 5mm no exame inicial e 180 dias após a terapia.

Variáveis	Tempo	Grupos de tratamento			ANCOVA p-value
		RAR n=20	RAR+MTZ n=20	RAR+MTZ+AMX n=19	
PD≥5mm	Início	38.0 ± 14.9 [a]	37.7 ± 17.1 [a]	39.3 ± 16.0 [a]	
	180 dias	15.8 ± 13.2 [a, A]	7.0 ± 6.8 [b,B]	5.1 ± 5.0 [b, B]	**0.001**
	Δ 0-180dias	22.2 ± 12.8 [A]	30.7 ± 15.2 [B]	34.2 ± 13.8 [B]	**0.029**

As diferenças significantes entre o início e 180 dias pós-terapia foram testadas pelo teste t-Student para amostras pareadas (letras maiúsculas indicam as diferenças existentes entre os tempos experimentais p<0,05). As diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos experimentais foram testadas pela análise de variância ANCOVA (ajustado para os dados do início do estudo).

RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; PS, profundidade de sondagem; DP, desvio padrão.

A tabela 4 apresenta para os 3 grupos experimentais a média de reduções ocorridas entre a consulta inicial e 180 dias pós-terapia, nas médias dos parâmetros de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, para a avaliação de boca toda, bem como para os sítios inicialmente moderados (PS 4-6mm) e profundos (PS≥ 7mm). Todas as terapias proporcionaram reduções nas médias dos parâmetros avaliados, entretanto os grupos que receberam antibioticoterapia sistêmica MTZ ou MTZ+AMX apresentaram reduções superiores em todas as avaliações quando comparados ao grupo que recebeu apenas RAR (p<0,05), entretanto sem diferenças significantes entre eles (p>0,05).

Tabela 4. Média das reduções de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção ocorridas entre a consulta inicial e 3 meses pós terapia nos dados da avaliação de boca toda, bem como de sítios inicialmente moderados (PS 4-6mm) e profundos (PS >7mm) nos 2 grupos terapêuticos.

	Variável	Grupos terapêuticos			ANCOVA
		RAR n=20	RAR+MTZ n=20	RAR+MTZ+AMX n=19	p-value
Boca toda	PS (mm)	0.65 ± 0.27 [A]	1.02 ± 0.46 [B]	1.23 ± 0.40 [B]	**0.00010**
	NCI (mm)	0.59 ± 0.30 [A]	0.85 ± 0.46 [B]	0.97 ± 0.40 [B]	**0.01379**
4-6mm	PS (mm)	1.16 ± 0.420 [A]	1.713 ± 0.53 [B]	1.815 ± 0.48 [B]	**0.00016**
	NCI (mm)	1.046 ± 0.43 [A]	1.46 ± 0.527 [B]	1.44 ± 0.359 [B]	**0.00629**
≥7mm	PS (mm)	2.85 ± 1.23 [A]	3.64 ± 0.81 [B]	3.92 ± 0.48 [B]	**0.00205**
	NCI (mm)	2.14 ± 1.22 [A]	2.90 ± 0.81 [B]	3.25 ± 0.57 [B]	**0.00193**

As diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos experimentais foram testadas pela análise de variância ANCOVA (ajustado para os dados do início do estudo). RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; PS, profundidade de sondagem; DP, desvio padrão..

4.2. Resultados microbiológicos

Os resultados obtidos nas avaliações microbiológicas, bem como na interação entre os parâmetros clínicos e a presença de *Archaea* estão

representados nas Tabelas 5 a 8. O número de indivíduos colonizados ou não colonizados pelo domínio *Archaea* nos grupos experimentais no inicio do estudo e aos 180 dias estão apresentados na Tabela 5. Trinta e nove indivíduos (66,1%), sendo 14 (70%) indivíduos do grupo RAR, 12 (60%) indivíduos do grupo MTZ e 13 (68,5%) indivíduos do grupo MTZ+AMX, eram colonizados pelo domínio *Archaea*, entretanto sem diferenças significativas entre os grupos (p=0,3440). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na prevalência de indivíduos colonizados por estes microrganismos aos 180 dias pós-terapia (p=0,4494). Todos

os grupos terapêuticos reduziram de forma significativa o número de indivíduos colonizados por *Archaea* ao longo do período experimental (p<0,05).

Tabela 5. Número de indivíduos colonizados ou não colonizados pelo domínio *Archaea* no início do estudo e aos 180 dias pós-terapia nos 3 grupos experimentais.

Variável	Tempo		Grupos de tratamento			Qui-quadrado p valor
			RAR n=20	RAR+MTZ n=20	RAR+MTZ+AMX n=19	
Archaea	Início	Positivo	14	12	13	0,3440
		Negativo	6	8	6	
	180 dias	Positivo	7	5	5	0,4494
		Negativo	13	15	14	

Diferenças na distribuição de sítios positivos e negativos entre os grupos foi testada pelo teste Qui-quadrado (*).RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; PS, profundidade de sondagem; DP, desvio padrão.

A tabela 6 apresenta o percentual médio de sítios colonizados pelo domínio *Archaea* no inicio do estudo e aos 180 dias pós-terapia nos 3 grupos experimentais. Dentre os indivíduos colonizados por estes microrganismos, o número de sítios colonizados por indivíduo variou de 6 (100%) a 1 (16,6%). De forma geral, 39,5% (2,3 sítios) dos sítios analisados eram colonizados por *Archaea*. Não houve diferenças significantes entre os grupos para o percentual de sítios colonizados no início do estudo. Todos os grupos experimentais reduziram de forma significativa o percentual de sítios colonizados aos 180 dias pós-terapia, sendo que os grupos MTZ e MTZ+AMX apresentaram uma média estatisticamente significativa inferior ao grupo RAR (p<0,05).

O nível médio de *Archaea* (Log10) no início do estudo e aos 180 dias pós-terapia nas amostras de biofilme subgengival nas 6 amostras coletadas e bem como nos sítios categorizados em rasos (PS≤3mm) e profundos (PS≥5mm) nos 3 grupos experimentais estão representados na Tabela 7. O número médio de *Archaea* encontrado nos indivíduos (média das 6 amostras) no início do estudo variou de $0,01X10^5$ a $2,5X10^6$, com uma média de $8,9X10^5$ células por indivíduo. Não foram observadas diferenças significantes para os níveis médios de *Archaea* no início do estudo na análise para todos os sítios, bem como nos sítios rasos e profundos. Os níveis de *Archaea* foram reduzidos significativamente aos 180 dias pós-terapia para

os 3 grupos terapêuticos em todas as análises apresentadas sem diferenças significativas entre os grupos terapêuticos, com exceção de uma redução mais profunda nos grupos MTZ e MTZ+AMX nos sítios com PS≥5mm (p<0,05).

Tabela 6. Média da % (±DP) de sítios colonizados pelo domínio *Archaea* no início do estudo e aos 180 dias pós-terapia nos 3 grupos experimentais

Variável	Tempo	Grupos de tratamento			ANCOVA p-valor
		RAR n=20	RAR+MTZ n=20	RAR+MTZ+AMX n=19	
Archaea	Início	42.5 ± 31.7[a]	36.2 ± 31.7 [a]	39.9 ± 28.3 [a]	
	180 dias	28.3 ± 32.0 [b, A]	11.2 ± 16.1 [b, B]	12.3 ± 13.4 [b, B]	**0,0307**

As diferenças significantes entre o início e 180 dias pós-terapia foram testadas pelo teste t-Student para amostras pareadas (letras maiúsculas indicam as diferenças existentes entre os tempos experimentais p<0,05). As diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos experimentais foram testadas pela análise de variância ANCOVA (ajustado para os dados do início do estudo).

RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; PS, profundidade de sondagem; DP, desvio padrão.

Tabela 7. Média dos níveis (*Log10*) de *Archaea* (±DP) no início do estudo e aos 180 dias pós-terapia nos 3 grupos experimentais para a avaliação de todos os sítios coletados, bem como para os sítios com PS<3mm e PS>5mm.

Variável	Tempo	Grupos de tratamento			ANCOVA p-valor
		RAR n=20	RAR+MTZ n=20	RAR+MTZ+AMX n=19	
Todos os sítios	Início	0.32 ± 0.31 [a]	0.27 ± 0.29 [a]	0.30 ± 0.24 [a]	
	180 dias	0.13 ± 0.23 [b]	0.06 ± 0.10 [b]	0.03 ± 0.08 [b]	0.1246
PS≤3mm	Início	0.29 ± 0.40 [a]	0.21 ± 0.26 [a]	0.17 ± 0.26 [a]	
	180 dias	0.06 ± 0.12 [b]	0.01 ± 0.04 [b]	0.02 ± 0.04 [b]	0.4902
PS≥5mm	Início	0.33 ± 0.42 [a]	0.31 ± 0.48 [a]	0.45 ± 0.36 [a]	
	180 dias	0.20 ± 0.37 [b, B]	0.07 ± 0.15 [b, B]	0.03 ± 0.07 [b, B]	**0.0420**

As diferenças significantes entre o início e 180 dias pós-terapia foram testadas pelo teste t-Student para amostras pareadas (letras maiúsculas indicam as diferenças existentes entre os tempos experimentais p<0,05). As diferenças estatísticas entre os grupos nos tempos experimentais foram testadas pela análise de variância ANCOVA (ajustado para os dados do início do estudo).

RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; PS, profundidade de sondagem; DP, desvio padrão.

Tabela 8. Média das reduções de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção ocorridas entre a consulta inicial e 180 dias pós-terapia nos dados da avaliação de boca toda, bem como de sítios inicialmente moderados (PS 4-6mm) e profundos (PS >7mm) em indivíduos colonizados ou não colonizados pelo domínio *Archaea* no início do estudo.

Variável	Tempo	Colonizado por *Archaea*		ANCOVA p-valor
		Positivo n=40	Negativo n=19	
Boca toda	PS	0.90 ± 0.33	0.99 ± 0.50	0.47580
	NCI	0.78 ± 0.34	0.81 ± 0.45	0.83240
PS 4-6mm	PS	1.51 ± 0.39	1.57 ± 0.62	0.70890
	NCI	1.37 ± 0.34	1.28 ± 0.53	0.54668
PS≥7mm	PS	3.42 ± 0.76	3.45 ± 1.12	0.91078
	NCI	2.99 ± 0.84	2.61 ± 1.10	0.20084

As diferenças estatísticas entre os grupos foram testadas pela análise de variância ANCOVA (ajustado para os dados do início do estudo).

RAR, raspagem e alisamento radicular; MTZ, metronidazol; AMX, amoxicilina; PS, profundidade de sondagem; DP, desvio padrão.

Com o objetivo de verificar a influência do domínio *Archaea* na resposta clínica periodontal, os indivíduos foram categorizados conforme a presença deste microrganismos, independentemente do grupo terapêutico. Assim sendo, foram analisados 40 indivíduos colonizados por *Archaea* em relação a 19 indivíduos que eram negativos para a presença deste domínio no início do estudo. Desta forma, as análises das alterações clínicas nos dados de boca toda, bem como nos dados de sítios inicialmente intermediários e profundos foram repetidas (Tabela 8). Observa-se que o fato do indivíduo ser colonizado por *Archaea* não influenciou a resposta clínica dos indivíduos, visto que não foram observados diferenças significativas para nenhuma das análises realizadas.

5. DISCUSSÃO

Até o presente momento, microrganismos do domínio *Archaea* não foram ainda reconhecidos como verdadeiros patógenos de doenças humanas, incluindo infecções na cavidade bucal (Cavichiolli et al., 2003; Eckburg et al., 2003, Conway De Macario e Macario, 2008, Matarazzo et al. 2012). Desta forma, este estudo teve como objetivo contribuir para o conhecimento sobre o papel de microrganismos do domínio *Archaea* no ecossistema subgengival, visando estabelecer qual o comportamento da prevalência e dos níveis destes microrganismos frente a diferentes modalidades de terapias periodontais em indivíduos com periodontite crônica.

Os dados do presente estudo mostraram que as associação de MTZ ou MTZ+AMX levaram a efeitos benéficos superiores aos resultados clínicos quando comparados aos obtidos somente com a RAR. Apesar de que todas as terapias utilizadas no presente estudo levaram a uma melhora clínica aos 180 dias pós-terapia, os dois grupos que receberam antibióticos sistêmicos apresentaram uma maior redução de PS e ganho de inserção clínica, bem como menor número de sítios residuais com PS$\geq$5mm aos final do período experimental. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que também associaram esses antibióticos no tratamento da periodontite crônica (Carvalho et al. 2005, Socransky et al. 2013).

Os indivíduos do presente estudo apresentavam-se altamente colonizados por microrganismos do domínio *Archaea,* sem diferenças estatísticas entre os grupos terapêuticos ($p>0,05$). Estes microrganismos foram detectados 66,1% (39 indivíduos) dos indivíduos com periodontite crônica. Além disso, aproximadamente 40% dos sítios analisados apresentaram a presença destes microrganismos. Os presentes resultados corroboram com estudos prévios que investigaram a prevalência de *Archaea* no ambiente subgengival em diferentes populações (Brusa et al. 1987, Belay et al. 1988, Brusa et al. 1993, Ferrari et al. 1994, kulik et al. 2001, Robichaux et al. 2003a, 2003b, Lepp et al. 2004, Yamabe et al. 2008, Vianna et al. 2008, Li et al. 2009, Vianna et al. 2009, Faveri et al. 2011, Matarazzo et al. 2011, Horz et al. 2012, Mansfield et al. 2012, Lira et al. 2013). Em uma revisão da literatura sobre a influência dos microrganismos *Archaea* no ambiente subgengival, Nguyen-Hieu et al. (2012) relataram que a prevalência de *Archaea* em indivíduos com

periodontite apresentava uma variação de aproximadamente 22% a 96%, com uma média de prevalência em torno de 41%. Assim sendo, observamos uma maior prevalência de *Archaea* em nossa população quando comparados a prevalência reportada em outras regiões geográficas. Lepp et al. (2004) e Yamabe et al. (2008) estudaram a prevalência de *Archaea* em uma população americana e japonesa, por meio de PCR convencional e PCR quantitativo, respectivamente. Os autores relataram que 22,4% da população americana e 36% da população japonesa, ambas com periodontite crônica, eram colonizados por *Archaea*. Utilizando iniciadores para o gene *mcrA,* Vianna et al. (2008) relataram uma prevalência de 43,1% dos indivíduos de origem alemã com sinais clínicos de destruição periodontal. Aspectos metodológicos, como número de amostras analisadas por indivíduo e métodos de análises podem justificar tais diferenças. Outro ponto que deve ser considerado são as diferenças geográficas das populações estudadas. Diferenças na presença de microrganismos periodontopatogenicos foram relatadas em amostras de biofilme gengival de indivíduos com periodontite crônica de diferentes regiões geográficas (Haffajee et al., 2004; Haffajee et al., 2005). Da mesma maneira, as evidências apontam diferenças na prevalência de microrganismos metanogênicos entre populações. A análise do nível de metano no hálito permitiu mostrar que a proporção de metanogênicos entre a população adulta nos Estados Unidos e na Grã-Bretanha foi maior do que no Japão (Morii et al., 2003).

Independentemente da modalidade terapêutica empregada no tratamento, observou-se uma redução significante na prevalência de indivíduos, nos níveis de contagem e na prevalência de sítios positivos para a presença de *Archaea* aos 180 dias (Tabela 5, 6 e 7). Ao início do estudo, 14, 12 e 13 indivíduos eram colonizados por estes microrganismo nos grupos RAR, MTZ e MTZ+AMX, respectivamente. Aos 180 dias, os 3 grupos terapêuticos conseguiram reduzir em aproximadamente 50% o número de indivíduos colonizados, entretanto sem diferenças estatísticas entre eles. Estes resultados corroboram com um estudo prévio que observou uma redução significativa no número de indivíduos colonizados após a terapia periodontal em indivíduos com periodontite agressiva generalizada tratados por meio de RAR ou RAR+MTZ+AMX (Lira et al. 2013). Entretanto, observou-se que aos 180 dias, os indivíduos dos grupos que receberam a antibioticoterapia sistêmica apresentaram um menor percentual de sítios colonizados, bem como menores níveis de contagem em sítios com PS inicial $\geq$5mm quando comparados aos indivíduos que receberam

apenas RAR (Tabela 6 e 7). Os resultados obtidos são de difícil comparação uma vez que este é o primeiro estudo clínico que analisou as alterações nos níveis destes microrganismos antes e após diferentes modalidades de terapia periodontal. Todavia, a redução da população de *Archaea* apresentada no presente estudo esta de acordo Lepp et al. (2004), no qual selecionaram 77 amostras provenientes de 6 indivíduos com periodontite aos 12-18 meses após a RAR. Os autores observaram uma redução na proporção de cópias do gene *16S rRNA* de *Archaea* frente ao total de microrganismos procariotas de 12,3 % para 0,0056%. Entretanto, uma redução mais profunda foi observada nos grupos que receberam MTZ e MTZ+AMX quando comparados ao grupo RAR. Esta redução mais acentuada no percentual de sítios colonizados e nos níveis de *Archaea* provocada pela associação de terapias corrobora com estudos prévios que observaram benefícios microbiológicos quando estes antibióticos sistêmicos foram associados a RAR (Carvalho et al. 2005, Mestnik et al. 2010, Silva et al. 2011, Mestnik et al. 2012, Socransky et al. 2013).

Archaeas são caracterizados por sua resistência de amplo espectro a diferentes antibióticos/antimicrobianos, mesmo em concentrações superiores a 100 mg/L (Dridi et al. 2011). Dridi et al. (2011) demonstrou que *M. oralis* era resistente a vários antibióticos, principalmente a ampicilina, estreptomicina, gentamicina, rifampicina, ofloxacina, tetraciclina e vancomicina. Os autores relatam que as diferença na composição da parede celular entre *Archaea* e Bactéria é o principal fator deste amplo espectro de resistência encontrados nesses microrganismos, visto que estes antibióticos atuam preferencialmente nesta estrutura celular. Entretanto, *Archaea* são susceptíveis ao uso de MTZ visto que o mecanismo de ação do MTZ consiste na inibição da síntese de ácido desoxirribonucléico e na degradação do DNA (Mestnik et al. 2010, Silva et al. 2011, Mestnik et al. 2012, Socransky et al. 2013). Desta forma, o uso de MTZ em ambos os grupos que receberam antibióticos sistêmicos justifica a ausência de diferenças estatísticas entre eles aos 180 dias pós-terapia.

Com o objetivo de verificar se o perfil de colonização de *Archaea* poderia interferir na resposta clínica frente o tratamento periodontal, os indivíduos foram categorizados, independentemente de sua modalidade terapêutica, em dois subgrupos conforme sua presença no ambiente subgengival (Tabela 8). Observou-se que a redução de PS e o ganho de inserção clínica não foi influenciado pelo perfil de colonização de *Archaea*. Os dados do presente estudo estão de acordo com

estudos prévios que não observaram diferenças nas respostas clínicas ao tratamento de indivíduos colonizados ou não por importantes periodontopatógenos antes do início do tratamento (Flemming et al. 1998, Mombelli et al. 2013). Mombelli et al. (2013) selecionaram 41 indivíduos com periodontite crônica colonizados por *A. actinomycetemcomitans* e 41 indivíduos que não se apresentavam colonizados por este microrganismo no início do estudo. Todos os indivíduos receberam RAR+MTZ+AMX e os autores não relataram diferenças clínicas frente a este tratamento para ambos os grupos. Os autores concluem que o fato dos indivíduos serem positivos ou não para o *A. actinomycemcomitans* não influenciou os efeitos benéficos do uso dos antibióticos.

Apesar das evidencias existentes na literatura sobre a participação de *Archaea* na microbiota em humanos, ainda não são conhecidos exemplos de patógenos deste terceiro domínio da vida. Pelos resultados apresentados, ainda não está bem clara a contribuição destes microrganismos na patogênese das doenças periodontais, entretanto observamos que os dois grupos terapêuticos que apresentaram melhores resultados clínicos, MTZ e MTZ+AMX, também reduziram de forma mais profunda o percentual de sítios colonizados, bem como os níveis de *Archaea* em sítios profundos. Desta forma, existe um consenso de que este domínio, uma vez que nenhum mecanismo de virulência direta foi encontrado, possui uma relação indireta com as doenças infecciosas, favorecendo o crescimento de outros microrganismos, os quais, por sua vez, estão diretamente envolvidos na patogênese (Lepp et al. 2004, Vianna et al. 2006, Higuchi et al. 2009). Assim sendo, sugere-se que esta redução mais acentuada de *Archaea* nos indivíduos que receberam antibióticos sistêmicos possa ter sido influenciada pela ação direta dos agentes antimicrobianos ou então pela alteração mais profunda de toda a comunidade microbiana e que por consequência influenciou o perfil de colonização de *Archaea*. Entretanto, estas hipóteses precisam ser ainda estudadas. Desta forma, é interessante estabelecer a relação da alteração de importantes periodontopatógenos em conjunto com os microrganismos do domínio Archaea com o objetivo de sedimentar de forma mais sustentável o envolvimento ou não destas espécies com as doenças periodontais.

6 .CONCLUSÃO

O uso de MTZ e MTZ+AMX associado a RAR proporcionou maior redução no número de sítios colonizados e nos níveis de *Archaea* em sítios com PS≥5mm quando comparado a RAR isoladamente. O perfil de colonização de *Archaea* antes da terapia periodontal não influenciou as respostas clínicas no tratamento de indivíduos com periodontite crônica.

REFERÊNCIAS

Belay N. Mukhopadhyay B. Conway de Macario E. Galask R. Daniels L. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. J Clin Microbiol. 1990 Jul;28(7):1666-8.

Cavicchioli R, Curmi PM, Saunders N, Thomas T. Pathogenic archaea: do they exist? Bioessays. 2003 Nov;25(11):1119-28.ckburg et al., 2003

Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA. Archaea and their potential role in human disease. Infect Immun. 2003 Feb;71(2):591-6.

Faveri M, Mayer MP, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. Oral Microbiol Immunol. 2008 Apr;23(2):112-8.

Golçalves L, Mayer MPA, Shibli JA, Feres M, Figueiredo LC, Faveri M. Prevalence and microbiological diversity of Archaea in peri-implantitis subjects by 16SrRNA clonal analysis. Journal of Periodontal Research 2010 (*in press*)

Kulik EM, Sandmeier H, Hinni K, Meyer J. Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis. FEMS Microbiol Lett. 2001 Mar 15;196(2):129-33.

Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, Palm K, Armitage GC, Relman DA. Pathogenic Archaea and human periodontal disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 20;101(16):6176-81.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001 Jun;183(12):3770-83.

Robichaux M, Howell M, Boopathy R. Growth and activities of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in human oral cavity. Curr Microbiol. 2003 Jul;47(1):12-6.

Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. J Periodontal Res. 2005 Jun;40(3):277-85.

Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcrA gene analysis. BMC Microbiol. 2008 May 20;8:79.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005;38:135-87.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. Nature. 2007 Oct 18;449(7164):804-10.

Vianna ME, Holtgraewe S, Seyfarth I, Conrads G, Horz HP. Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. J Bacteriol. 2008 May;190(10):3779-85.

Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006 Apr;44(4):1274-82.

Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. J Med Microbiol. 2007 Jan;56(Pt 1):110-8.

Woese CR. Evolutionary questions: the "progenote". Science. 1990 Feb 16;247(4944):789.

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

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int DentJ. 1975 Dec; 25(4): 229-35.

Araujo, MW, Hovey KM, Benedek JR, Grossi SG, Dorn J, Wactawski-Wende J, Genco RJ, Trevisan M. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. J Periodontol.2003,74:1736-40.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases andconditions. Ann Periodontol 1999; 4: 1-6. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 1996 Aug;11(4):266-73.

Avila-Campos MJ, Sacchi CT, Whitney AM, Steigerwalt AG, Mayer LW. Arbitrarily primed-polymerase chain reaction for identification and epidemiologic subtyping of oral isolates of Fusobacterium nucleatum. J Periodontol. 1999 Oct;70(10):1202-8.

Belay N, Mukhopadhyay B, Conway de Macario E, Galask R, Daniels L. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. J Clin Microbiol. 1990 Jul;28(7):1666-8.

Boyer M, Madoui MA, Gimenez G, La Scola B, Raoult D. Phylogenetic and phyletic studies of informational genes in genomes highlight existence of a 4 domain of life including giant viruses. PLoS One. 2010 Dec 2;5(12):e15530.

Brusa T, Conca R, Ferrara A, Ferrari A, Pecchioni A. The presence of methanobacteria in human subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1987 Sep;14(8):470-1.

Brusa T, Rutili A, Canzi E, Ferrari A. Human intestinal methanogens and lactulose administration. New Microbiol. 1993 Jan;16(1):99-104.

Cavicchioli R, Curmi PM, Saunders N, Thomas T. Pathogenic Archaea: do they exist? Bioessays. 2003 Nov;25(11):1119-28.

Christersson LA, Albini B, Zambon JJ, Wikesjö UM, Genco RJ. Tissue localization of Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. J Periodontol. 1987Aug;58(8):529-39.

Conway de Macario E, Macario AJ. Methanogenic Archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. Int J Med Microbiol. 2008 Feb;299(2):99-108.

Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. The Human Gut Microbiome and Body Metabolism: Implications for Obesity and Diabetes. Clin Chem. 2013 Mar 1.43

Di Murro C, Paolantonio M, Pedrazzoli V, Lopatin DE, Cattabriga M. Occurrence of Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus, and Treponema denticola inperiodontally healthy and diseased subjects as determined by an ELISA technique. JPeriodontol. 1997 Jan;68(1):18-23.

Dridi B, Henry M, El Khéchine A, Raoult D, Drancourt M. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. PLoS One. 2009 Sep 17;4(9):e7063.

Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA. *Archaea* and their potential role in human disease. Infect Immun. 2003 Feb;71(2):591-6.

Einen J, Thorseth IH, Ovreås L. Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. FEMS Microbiol Lett. 2008 May;282(2):182-7. 18.

Faveri M, Figueiredo LC, Duarte PM, Mestnik MJ, Mayer MP, Feres M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. J Clin Periodontol. 2009 Jul 21.

Faveri M, Gonçalves LF, Feres M, Figueiredo LC, Gouveia LA, Shibli JA, Mayer MP.Prevalence and microbiological diversity of *Archaea* in peri-implantitis subjects by 16Sribosomal RNA clonal analysis. J Periodontal Res. 2011 Jun;46(3):338-44.

Faveri M, Mayer MP, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. Oral Microbiol Immunol. 2008 Apr;23(2):112-8.

Ferrari A, Brusa T, Rutill A, Canzi E, Biavati B. Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis sp.* Curr. Microbiol. 1994 Nov: 29: 7-12.

Gmür R, Thurnheer T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. Microbiology. 2002 May;148(Pt5):1379-87.

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

Haffajee AD, Dibart S, Kent RL Jr, Socransky SS. Factors associated with different responses to periodontal therapy. J Clin Periodontol. 1995 Aug;22(8):628-36.

Haffajee AD, Socransky SS, Dibart S, Kent RL Jr. Response to periodontal therapy in patients *with high or low levels of P. gingivalis, P. intermedia, P. nigrescens* and *B. forsythus*. J Clin Periodontol. 1996 Apr;23(4):336-45.

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 Nov;31(11):996-1002.44

Haffajee, A.D.; Japlit, M.; Bogren, A.; Kent, R. L. JR.; Goodson, J. M.; Socransky, S. S. Differences in the subgingival microbiota of Swedish and USA subjects who were periodontally healthy or exhibited minimal periodontal disease. J. Clin. Periodontol. v. 32, p. 33-39, 2005.

Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, Worthington H, Palmer J, Bird P, Narayanan D,Davies R, Seymour G. Persistent colonization with Tannerella forsythensis and loss ofattachment in adolescents. J Dent Res. 2004 Mar;83(3):232-5.

Horz HP, Seyfarth I, Conrads G. McrA and 16S rRNA gene analysis suggests a novel lineage of Archaea phylogenetically affiliated with Thermoplasmatales in human subgingival plaque. Anaerobe. 2012 Jun;18(3):373-7.

Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. Nucleic Acids Res. 2001 Jan 1;29(1):181-4.

Klein MI, Gonçalves RB. Detection of Tannerella forsythensis (Bacteroides forsythus) and porphyromonas gingivalis by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. J Periodontol. 2003 Jun;74(6):798-802.

Kolenbrander PE, Egland PG, Diaz PI, Palmer RJ Jr. Genome-genome interactions: bacterial communities in initial dental plaque. Trends Microbiol. 2005 Jan;13(1):11-5.

Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Iida T, Shizukuishi S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. Oral Microbiol Immunol. 2004 Jun;19(3):168-76.

Kulik EM, Sandmeier H, Hinni K, Meyer J. Identification of Archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis. FEMS Microbiol Lett. 2001 Mar 15;196(2):129-33.

Langendijk-Genevaux PS, Grimm WD, van der Hoeven JS. Sulfate-reducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. J Clin Periodontol. 2001 Dec;28(12):1151-7.

Lepp, P.W.; Bring, M.M.; Ouverney, C.C.; Palm, C.; Armitage G.C.; Relman D.A.Methanogenic *Archaea* and human periodontal disease. Proc Natl Acad Sci USA, v. 16,p.6176-81, 2004.

Li CL, Liu DL, Jiang YT, Zhou YB, Zhang MZ, Jiang W, Liu B, Liang JP. Prevalence and molecular diversity of Archaea in subgingival pockets of periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol. 2009 24, 343-6

Li CL, Jiang YT, Zhang MZ, Liang JP. Identification and quantitative analysis of Archaea involved in periodontal disease. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2008 43, 589-91.45

Listgarten MA, Helldén L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. J Clin Periodontol. 1978 May;5(2):115-32.

Löe H, Anerud A, Boysen H, Smith M. The natural history of periodontal disease in man. The rate of periodontal destruction before 40 years of age. J Periodontol. 1978 Dec;49(12):607-20.

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 May;13(5):431-45.

Loe H, Theilade E, Jensen Sb. Experimental gingivitis in man. J Periodontol. 1965 May-Jun;36:177-87.

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

Matarazzo F, Ribeiro AC, Faveri M, Taddei C, Martinez MB, Mayer MP. The domain Archaea in human mucosal surfaces. Clin Microbiol Infect. 2012 Sep;18(9):834-40.

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

McConnell DJ, Searcy DG, Sutcliffe JG. A restriction enzyme Tha I from the thermophilic mycoplasma Thermoplasma acidophilum. Nucleic Acids Res. 1978 Jun;5(6):1729-39.

Morii H, Koga Y. CDP-2,3-Di-O-geranylgeranyl-sn-glycerol:L-serine Oarchaetidyltransferase (archaetidylserine synthase) in the methanogenic *Archaea* on *Methanothermobacter thermautotrophicus*. J Bacteriol. 2003 Feb;185(4):1181-9.

Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology. 2002 Jan;148(Pt 1):257-66.

Nguyen-Hieu T, Khelaifia S, Aboudharam G, Drancourt M. Methanogenic *Archaea* in subgingival sites: a review. APMIS. 2012 Oct 19.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001 Jun;183(12):3770-83.

Robichaux M, Howell M, Boopathy R. Growth and activities of sulfate-reducing andmethanogenic bacteria in human oral cavity. Curr Microbiol. 2003 Jul;47(1):12-6.

Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. J Periodontal Res. 2005 Jun;40(3):277-85.46

Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcrA gene analysis. BMC Microbiol. 2008 May 20;8:79.

Siqueira JF, Rôças IN, Baumgarter JC, Xia T. Searching for *Archaea* in infections of endodontic origin. J Endod. 2005, 31: 719-721.Socransky SS,

Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28:12-55.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. Biotechniques. 1994 Oct;17(4):788-92.

Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. J Clin Periodontol. 1988 Aug;15(7):440-4.

Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. J Clin Periodontol. 2002 Mar;29(3):260-8.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998 Feb;25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005;38:135-87.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. Thehuman microbiome project. Nature. 2007 Oct 18;449(7164):804-10.

Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. T-RFLP-based mcrA gene analysis of methanogenic *Archaea* in association with oral infections and evidence of anovelMethanobrevibacter phylotype. Oral Microbiol Immunol. 2009 Oct;24(5):417-22.

Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of *Archaea* involved in primary endodontic infections. J Clin Microbiol. 2006 Apr;44(4):1274-82.

Vianna ME, Holtgraewe S, Seyfarth I, Conrads G, Horz HP. Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic *Archaea*, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. J Bacteriol. 2008 May;190(10):3779-85.

Vianna, M. E.; Conrads, C.; Gomes, B. P. F. A.; Hortz H. P. Identification and quantification of *Archaea* involved in primary endodontic infections. J. Clin. Microbiol., v. 44, n. 4; p. 1274-1282, 2006.

Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and Archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. J Med Microbiol. 2007 Jan;56(Pt 1):110-8. 47.

Lira EA, Ramiro FS, Chiarelli FM, Dias RR, Feres M, Figueiredo LC, Faveri M. Redução na prevalência de Archaea após a terapia periodontal em indivíduos com periodontite agressiva generalizada.Aust J Dent 2013 Dec;. 58 (4) :442-7

Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Soares G, Teles RP, Fermiano D,Duarte PM, Faveri M.Os efeitos do metronidazol adjuvante mais amoxicilina no tratamento da periodontite agressiva generalizada: uma de 1 ano, duplo-cego, controlado por placebo, ensaio clínico randomizado. J Clin Periodontol . 2012 Out; 39 (10) :955-61.

Woese CR. Evolutionary questions: the "progenote". Science. 1990 Feb 16;247(4944):789.

Wrede C, Dreier A, Kokoschka S, Hoppert M. Archaea in symbioses. Archaea. 2012;2012:596846.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. J Clin Periodontol. 2000Sep;27(9):648-57.

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

UnG

CEPPE

Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Guarulhos, 08 de novembro de 2007.

Exmo. Sr.
Prof. Marcelo de Faveri

PARECER Nº 156/2007

Referência: **Aprovação de Projeto**
SISNEP/295 - "Efeitos clínicos e microbiológicos da associação sistêmica de amoxicilina e metronidazol a raspagem e alisamento radicular em indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada"

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Efeitos clínicos e microbiológicos da associação sistêmica de amoxicilina e metronidazol a raspagem e alisamento radicular em indivíduos com doença periodontal agressiva generalizada" - SISNEP/295, na reunião de 06.11.2007, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado.**

As orientações abaixo devem ser consideradas pelo Pesquisador Responsável durante a realização da pesquisa, visando que a mesma se desenvolva respeitando os padrões éticos:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclarecemos a necessidade da apresentação de relatório de andamento até **15.04.09** e relatório final até **15.11.10.**

Luciene Cristina de Figueiredo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa