



**Mestrado em Odontologia**  
**Área de concentração em Periodontia**

**GEISLA MARY SILVA SOARES**

**EFEITOS MICROBIOLÓGICOS DA TERAPIA  
PERIODONTAL MECÂNICA ASSOCIADA AO  
METRONIDAZOL E À AMOXICILINA SISTÊMICOS E  
AO CONTROLE QUÍMICO DO BIOFILME  
SUPRAGENGIVAL**

Guarulhos  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**GEISLA MARY SILVA SOARES**

**EFEITOS MICROBIOLÓGICOS DA TERAPIA  
PERIODONTAL MECÂNICA ASSOCIADA AO  
METRONIDAZOL E À AMOXICILINA SISTÊMICOS E  
AO CONTROLE QUÍMICO DO BIOFILME  
SUPRAGENGIVAL**

Dissertação apresentada à Universidade  
Guarulhos para obtenção do grau de  
Mestre em Odontologia  
Área de concentração: Periodontia.

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

Guarulhos  
2009

S676e Soares, Geisla Mary Silva  
Efeitos microbiológicos da terapia periodontal mecânica associada ao metronidazol e à amoxicilina sistêmicos e ao controle químico do biofilme supragengival/ Geisla Mary Silva Soares. Guarulhos, SP, 2009.

83 f. ; 31 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em Periodontia) - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2009.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Magda Feres  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciene C. de Figueiredo  
Bibliografia: f. 69 - 80

1. Raspagem e alisamento radicular. 2. Periodontite crônica. 3. Terapia periodontal. 4. Microbiologia. 5. Odontologia  
I. Título. II. Universidade Guarulhos.

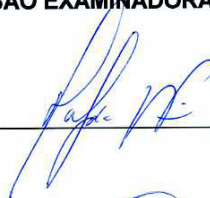
CDD 22<sup>st</sup> 617.632

Ficha catalográfica elaborada pela Coordenação da Biblioteca Fernando Gay da Fonseca

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "EFEITOS MICROBIOLÓGICOS DA TERAPIA PERIODONTAL MECÂNICA ASSOCIADA AO METRONIZADOL E À AMOXICILINA SISTÊMICOS E AO CONTROLE QUÍMICO DO BIOFILME SUPRAGENGIVAL" em sessão pública realizada em 29 de Maio de 2009, considerou a candidata Geisla Mary Silva Soares aprovada com louvor.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Profa. Dra. Magda Feres (UnG)



2. Prof. Dr. Eduardo Jorge Feres Filho (UFRJ)



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



Guarulhos, 29 de Maio de 2009.

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Bárbara e Aprígio, as pessoas que mais amo, mais admiro. Com muita fé, força, coragem, determinação e união realizaram seus sonhos e alcançaram seus objetivos. Tiraram de onde não tinha, colocaram onde não havia nada, acreditaram no que parecia impossível e construíram o mundo de nossa família. Onde os maiores valores são fé em Deus, honestidade e integridade e eles são a base e os alicerces.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pela vida, por guiar os meus passos e por ter me abençoado em cada dia, permitindo que tudo contribuísse para meu crescimento pessoal e profissional.*

*Aos meus pais, por toda educação e formação que me deram. Por todo amor e carinho. Pelos exemplos de fé, determinação, honestidade e integridade. Por me apoiarem nos meus sonhos e me ajudarem a alcançar meus objetivos.*

*Aos meus irmãos. Emerson, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo. Bárbara, pela amizade, conselhos, ajuda em todos os momentos. Géser, pelo apoio e confiança.*

*Ao meu cunhado Lincoln, que com minha irmã Bárbara está sempre presente, me apoiando.*

*Às minhas sobrinhas Rebeca, Laura e Malu, por me proporcionarem momentos de tanta alegria.*

*Agradeço à minha orientadora, profa. Dra. Magda Feres, por todos os ensinamentos, toda orientação, cuidado e ajuda, nesses dois anos e na execução dessa pesquisa. Pelo exemplo de profissionalismo e competência.*

*A minha co-orientadora, profa. Dra. Luciene Figueiredo, por toda ajuda e dedicação.*

*Ao prof. Dr. Marcelo de Faveri por ajudar, orientar e acompanhar em toda realização desta pesquisa.*

*Aos demais professores, Poliana Duarte, por estar sempre presente, pela amizade e ensinamentos; Jamil Shibli, pelo otimismo constante; Marta Bastos, por mostrar o quão incrível é o mundo da imunologia; Cláudia, pela paciência e tranquilidade em ensinar. José Augusto, Alessandra, Sérgio Sato. Todos, que com muita dedicação e profissionalismo em muito contribuíram nesses dois anos de formação.*

*À Izilvânia, bióloga responsável pela parte laboratorial da pesquisa, muito obrigada por seu trabalho, por sua dedicação e toda ajuda nesta parte.*

*Ao prof. Ricardo Luis Grein, que acreditou na minha capacidade, me incentivou para fazer o curso de mestrado e me apresentou esta instituição. A quem devo muito do meu aprendizado em periodontia.*

*À Cintia, auxiliar da clínica, sempre esteve pronta à ajudar.*

*Ao ex-alunos do mestrado Tatiana e Maike, pela amizade e por contribuírem em parte desta pesquisa. Maike, agradeço por toda ajuda e incentivo.*

*Às alunas de iniciação científica Patrícia, Camila, Priscila Ferrão, Gisele e Priscila Lara, que em diversos momentos colaboraram para realização deste trabalho.*

*Aos meus colegas de turma, que fizeram esse período de muito estudo, trabalho e dedicação ser leve e prazeroso, agradeço pela amizade e alegria de estarmos juntos.*

*Carlos Eduardo Datti, Marcelo Raffaeli, Marcelo Rocha e Eduardo Sampaio.*

*Kelly, uma exímia mãe, amiga e profissional; Vanessa, a mais jovem e mais exigente, uma grande amiga;*

*À Josefa, um pouco mãe e muito amiga, agradeço pela amizade, carinho e ajuda sem limite; Joyce, me ensinou que o ritmo da vida pode ser mais lento, mas nem por isso devagar, amiga de todos os momentos.*

*À Juliana, minha dupla de pesquisa. Obrigada por toda ajuda, por tantos dias de trabalho e de alegrias juntas. Obrigada pela compreensão dos dias que estava longe. Somente com sua ajuda foi possível realizarmos tamanho trabalho.*

*Aos funcionários da clínica, Adriana, André, Kleber e Regina, pelo auxílio e prestatividade constantes, permitindo o bom andamento da clínica.*

*À Cristina Zoucas pela colaboração e cuidado na organização da parte burocrática.*

*À FAPESP, pelo incentivo científico e financiamento da parte laboratorial da pesquisa. Processo nº 07/55291-9.*

*Aos pacientes voluntários, fundamentais para realização desta pesquisa.*

*Muito Obrigada a todos!!!!*



*"A minha preocupação não está em ser  
coerente com as minhas afirmações  
anteriores sobre determinado problema,  
mas em ser coerente com a verdade."*

Gandhi

## RESUMO

O objetivo do presente estudo clínico cego, aleatorizado e placebo-controlado foi avaliar os efeitos microbiológicos da raspagem e alisamento radicular (RAR) combinada a antibióticos sistêmicos (metronidazol/amoxicilina ou metronidazol) e ao controle do biofilme supragengival, por meio de bochechos de clorexidina, no tratamento de indivíduos com periodontite crônica. Cento e dezessete indivíduos foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos terapêuticos: controle (n=19): RAR; Teste 1 (n=20): RAR + bochechos com clorexidina 0,12% 2x/dia por 2 meses (CLX); Teste 2 (n=20): RAR + metronidazol sistêmico (400mg) 3x/dia por 14 dias (MTZ); Teste 3 (n=20): RAR+MTZ+CLX; Teste 4 (n=19): RAR+MTZ+ amoxicilina (500mg) sistêmica, 3x/dia por 14 dias (AMX) e Teste 5 (n=19): RAR+MTZ+AMX+CLX. Os parâmetros clínicos avaliados em seis sítios por dente no início do estudo e 6 meses pós-RAR, foram: profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração. Nove amostras de biofilme subgengival foram coletadas por indivíduo, 3 amostras em cada uma das seguintes categorias de PS iniciais: rasa (PS ≤ 3 mm), moderada (PS 4-6 mm) e profunda (PS ≥ 7 mm). As amostras foram avaliadas para os níveis e proporções de 40 espécies bacterianas por meio do teste *checkerboard DNA-DNA hybridization*. As reduções mais acentuadas nas proporções dos patógenos do complexo vermelho ocorreram nas terapias que associaram antibióticos, principalmente no grupo MTZ+AMX+CLX, que apresentou os menores níveis e proporções desses três patógenos aos 6 meses de observação. Todas as terapias combinadas também reduziram mais efetivamente os patógenos do complexo laranja do que a RAR somente; porém, esses benefícios foram menos evidentes no grupo do MTZ. Todas as terapias levaram a graus variados de aumento na proporção das espécies benéficas, principalmente as dos grupos teste. Porém, nota-se um efeito positivo adicional no aumento das proporções de espécies compatíveis com o hospedeiro com o uso das quatro terapias associadas. Os indivíduos desse grupo tiveram aumentos significativos nas proporções individuais de *A. gerencseriae* e *A. naeslundii 2* na avaliação de boca toda e em bolsas inicialmente rasas, e das cinco espécies de *Actinomyces* nas bolsas inicialmente profundas. Em conclusão, a associação de terapias à RAR levou às alterações mais benéficas na composição da microbiota subgengival. O perfil microbiológico mais compatível com saúde foi observado nos grupos MTZ+CHX, MTZ+AMX e principalmente, MTZ+AMX+CLX. Os grupos CLX e MTZ também mostraram resultados superiores aos observados com a RAR, porém esses benefícios foram mais discretos do que os observados nos demais grupos teste.

**Palavras-chave:** periodontite crônica, antibioticoterapia, clorexidina, raspagem e alisamento radicular, microbiologia.

## ABSTRACT

The aim of the present blind, randomized and placebo-controlled clinical trial was to evaluate the microbiological effects of scaling and root planing (SRP) associated to systemic antibiotics (metronidazole/amoxicillin or metronidazole) and to supragingival biofilm control with chlorhexidine mouthrinse in the treatment of subjects with chronic periodontitis. One hundred and seventeen subjects were randomly assigned to six therapeutic groups: control (n=19): SRP, Test 1 (n=20): SRP+ chlorhexidine rinses 0.12%, 2x/day for 2 months (CLX); Test 2 (n=20): SRP+ systemic metronidazole (400mg) 3x/day for 14 days (MTZ); Test 3 (n=20): SRP+ CLX+MTZ; Test 4 (n=19): SRP+MTZ+ amoxicillin (500mg), 3x/day for 14 days (AMX) and Test 5 (n=19): SRP+MTZ+AMX+CLX. The clinical parameters evaluated at six sites per tooth at baseline and 6 months post-therapy were: probing depth, clinical attachment level, visible plaque, gingival bleeding, bleeding on probing and suppuration. Nine subgingival plaque samples were collected per subject, 3 samples in each of the following initial PD categories: shallow (PD ≤ 3mm), moderate (PD 4-6 mm), and deep (PD ≥ 7mm). The samples were evaluated for the levels and proportions of 40 subgingival bacterial species using the checkerboard DNA-DNA hybridization test. The most striking reductions in the proportions of red complex pathogens were observed after the treatments that associated antibiotics, especially in group MTZ+AMX+CLX that showed the lowest levels and proportions of these three pathogens at 6 months. The combined therapies were also more effective in reducing orange complex pathogens than SRP alone; however, these benefits were less evident in the MTZ group. All treatments led, in different degrees, to an increase in the proportions of the beneficial species, especially those from the test groups. However, the combination of the four therapies had an additional positive effect in raising the proportions of the host-compatible species. Subjects in this group showed a significant increase in the individual proportions of *A. gerencseriae* and *A. naeslundii* 2 in the full-mouth analysis and in initial shallow pockets, as well as in the five *Actinomyces* species evaluated in the initial deep pockets. In conclusion, the combination of therapies with SRP led to the most beneficial changes in the composition of the subgingival microbiota. The microbial profile most compatible with health was observed in groups MTZ+CHX, MTZ+AMX, and especially MTZ+AMX+CHX. Groups CHX and MTZ also showed better results in comparison with SRP alone; however, these benefits were less evident than those observed in the other test groups.

**Key-words:** Chronic periodontitis; Metronidazole; Amoxicillin; Chlorhexidine  
Periodontal treatment.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Delineamento experimental.....  | 32 |
| <b>Figura 2</b>  | Representação gráfica do Minislot 30 (Immunelectics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon (técnica checkerboard DNA-DNA hybridization).....   | 41 |
| <b>Figura 3</b>  | Representação gráfica do <i>Miniblotter</i> 45 (Immunelectics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i> )..... | 41 |
| <b>Figura 4</b>  | Representação esquemática do padrão de hibridização entre as bactérias presentes nas amostras de biofilme e as sondas de DNA (técnica <i>checkerboard DNA-DNA hybridization</i> ).....  | 42 |
| <b>Figura 5</b>  | Freqüência de sítios periodontais com profundidade de sondagem $\geq 5$ mm, nos seis grupos terapêuticos, no início do estudo, 3 e 6 meses pós-terapia.....   | 50 |
| <b>Figura 6</b>  | Perfil microbiano na contagem total das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-RAR, nos grupos terapêuticos.....   | 51 |
| <b>Figura 7</b>  | Perfil microbiano das médias de proporção (%) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo 3 e 6 meses pós-RAR, nos grupos terapêuticos.....  | 52 |
| <b>Figura 8</b>  | Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-terapia, nos grupos terapêuticos.....  | 53 |
| <b>Figura 9</b>  | Perfil microbiano das médias de proporção (%) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo 3 e 6 meses pós-RAR, nos grupos terapêuticos, nos sítios com PS $\geq 5$ mm.....                                       | 54 |
| <b>Figura 10</b> | Perfil microbiano das médias de proporção (%) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-RAR, nos grupos terapêuticos, nos sítios com PS $< 5$ mm.....   | 55 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 11</b> | Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-terapia, nos sítios com PS inicial $\geq$ 5 mm, nos grupos terapêuticos..... | 56 |
| <b>Figura 12</b> | Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-terapia, nos sítios com PS inicial $<$ 5 mm, nos grupos terapêuticos.....    | 57 |

## LISTA DE TABELAS

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Tabela 1</b> | Relação das cepas bacterianas empregadas para a confecção das sondas de DNA. As espécies estão agrupadas por complexos bacterianos (Socransky et al., 1998; Socransky & Haffajee, 2002)..... | 38 |
| <b>Tabela 2</b> | Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgengival .....  | 42 |
| <b>Tabela 3</b> | Média ( $\pm$ DP) dos parâmetros clínicos, no exame inicial, 90 dias e 180 dias pós-terapia, para os seis grupos terapêuticos.....   | 43 |
| <b>Tabela 4</b> | Percentual (%) das respostas afirmativas do questionário de efeitos adversos dos antibióticos, para os seis grupos terapêuticos.....   | 58 |
| <b>Tabela 5</b> | Percentual (%) das respostas afirmativas do questionário de efeitos adversos dos enxaguatórios, para os seis grupos terapêuticos.....  | 59 |

## SUMÁRIO

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1.      | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 15 |
| 1.1     | <b>Etiologia da doença periodontal</b> .....                               | 15 |
| 1.2     | <b>Terapia periodontal</b> .....   | 18 |
| 1.2.1   | Antibioticoterapia no tratamento periodontal .....                         | 18 |
| 1.2.1.1 | <i>Histórico</i> .....   | 18 |
| 1.2.1.2 | <i>Metronidazol e Amoxicilina</i> .....                                    | 19 |
| 1.2.1.3 | <i>Metronidazol associado à Amoxicilina</i> .....                          | 22 |
| 1.2.2   | Controle mecânico do biofilme supragengival .....                          | 23 |
| 1.2.3   | Controle químico do biofilme supragengival .....                           | 25 |
| 2.      | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....   | 27 |
| 3.      | <b>PROPOSIÇÃO</b> .....  | 28 |
| 4.      | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 29 |
| 4.1     | <b>Cálculo da potência</b> .....   | 29 |
| 4.2     | <b>Seleção dos indivíduos</b> .....  | 29 |
| 4.3     | <b>Crterios de inclusão e exclusão</b> .....                               | 30 |
| 4.4     | <b>Delineamento experimental</b> .....                                     | 30 |
| 4.5     | <b>Procedimentos terapêuticos</b> .....                                    | 31 |
| 4.5.1   | Terapia periodontal básica .....   | 31 |
| 4.5.2   | Administração de metronidazol e amoxicilina sistêmicos e<br>placebos ..... | 33 |
| 4.5.3   | Administração de bochecho com clorexidina e placebo .....                  | 33 |
| 4.6     | <b>Avaliação clínico-periodontal</b> .....                                 | 34 |
| 4.7     | <b>Avaliação microbiológica</b> .....                                      | 35 |
| 4.7.1   | Seleção dos sítios-testes .....  | 35 |
| 4.7.2   | Coleta das amostras do biofilme subgengival .....                          | 36 |
| 4.7.3   | Cepas bacterianas e condições de crescimento .....                         | 36 |
| 4.7.4   | Isolamento do DNA e preparo das sondas .....                               | 37 |
| 4.7.5   | <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i> .....                            | 38 |
| 4.7.6   | Deteccão das espécies .....  | 39 |
| 4.8     | <b>Análise estatística</b> .....   | 42 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                 | <b>44</b> |
| <b>6.</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>                  | <b>60</b> |
| <b>7.</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                 | <b>68</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>69</b> |
|           | <b>ANEXOS .....</b>                     | <b>89</b> |



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Etiologia das doenças periodontais

A etiologia das doenças periodontais tem sido estudada há muitas décadas e o seu caráter infeccioso específico foi sugerido há mais de um século. Entre 1880 e 1920 alguns pesquisadores estudaram a microbiota oral e sugeriram que certos microrganismos como amebas, espiroquetas, fusobactérias e estreptococcus poderiam ser responsáveis pelo início e progressão da destruição periodontal (BARRET, 1914 a,b; Le CLEAR, 1915; KOLLE, 1917; KRITCHEVSKY & SEGUIN, 1918; HARTZELL, 1925; FISHER, 1927; HARELL, 1931). Após esse período inicial, essa hipótese foi ignorada e entre os anos de 1920 e 1960 acreditava-se que as doenças periodontais estavam relacionadas a fatores sistêmicos e que a presença de microrganismos patogênicos seria apenas uma consequência do estabelecimento da doença (BUNTING, 1922; PRINTZ, 1926; HAUPL & LANG, 1927; GOTTLIEB, 1921 a,b,1928; GOLDMAN, 1968;).

Já na década de 60, novos estudos microbiológicos demonstraram que poderia ocorrer a transmissão de microrganismos orais e de periodontite entre animais, retomando assim a etiologia bacteriana dessas infecções (KEYES & JORDAN, 1964; GIBBONS et al. 1966; GIBBONS & SOCRANSKY, 1966). Gibbons e Socransky (1966) inocularam microrganismos presentes em bolsas periodontais de humanos em ratos “germ-free” e observaram perda óssea alveolar nesses animais. Outros estudos realizados nesse período por Lovdal et al. (1958), Schei et al.(1959); Løe et al. (1965); Theilade et al. (1966); Løe et al. (1967) e Russel (1967) também ressaltaram a importância do biofilme dental na etiologia da doenças periodontais.

Løe et al. (1965) realizaram o estudo clássico de “gingivite experimental” em humanos e demonstraram que a placa bacteriana levava ao aparecimento de gingivite e observaram uma relação direta entre o acúmulo de placa bacteriana e a inflamação gengival, além de uma alteração qualitativa nas proporções dos microrganismos presentes. Os autores também mostraram

que após a remoção da placa bacteriana o processo de inflamação gengival era revertido e o perfil microbiano restabelecido à situação de saúde.

Seguiu-se então uma fase em que se considerava que o acúmulo de biofilme na margem gengival levaria à produção de fatores irritantes e conseqüentemente à inflamação gengival e à destruição periodontal. Esta teoria ficou conhecida como a “Hipótese da placa não específica” (THEILADE, 1986), e relacionava as doenças gengivais e periodontais à quantidade de acúmulo de placa bacteriana e não a sua composição. Porém, com a continuidade dos estudos foi possível observar que em alguns indivíduos, mesmo na presença de grande quantidade de placa a doença não se desenvolvia, ou permanecia estável (LÖE et al., 1978 e 1986). Por outro lado, certos casos de doença periodontal progrediam de forma mais rápida e agressiva mesmo na presença de pouca placa e cálculo (LÖE et al., 1986; REDDY & PARKER, 1986; BAELUM, 1988). Løe et al. (1978 e 1986) avaliaram 480 plantadores de chá no Sri Lanka, por 15 anos, e observaram que 11% desses indivíduos, mesmo apresentando grande quantidade de biofilme, não mostravam progressão da doença periodontal. Por outro lado, Listgarten et al. (1976) avaliaram a microbiota em dentes naturais extraídos de indivíduos com diagnósticos de saúde, gengivite e periodontite e observaram diversas diferenças na composição do biofilme subgengival. Esses estudos retomaram a teoria de especificidade do biofilme, que ficou conhecida como a “Hipótese da placa específica” (LOESCHE, 1976). A partir daí grande parte da comunidade científica passou a acreditar que a composição do biofilme supra e subgengivais diferia entre indivíduos, e entre as diversas condições periodontais, tais como periodonto saudável, gengivite e periodontites. Essa teoria é aceita até os dias atuais.

Na década de 90 o desenvolvimento de técnicas imunológicas e de biologia molecular permitiu a detecção mais precisa das espécies bacterianas que compõem os biofilmes orais e a partir daí começou-se a estabelecer a relação entre os diferentes perfis microbianos e as diversas formas de periodontite (CHRISTERSSON et al., 1987; SOCRANSKY et al., 1988; SOCRANSKY & HAFFAJEE et al., 1994b; ÁVILA-CAMPOS et al., 1999; GOMES et al., 2006). 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. (1994c) descreveram a técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para diagnóstico microbiológico utilizando sondas de ácido desoxirribonucleico (DNA). Utilizando essa técnica de diagnóstico, esse grupo de pesquisadores avaliou 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, era composto pelas espécies *T. forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*, e foi fortemente relacionado com profundidade de sondagem (PS) e sangramento à sondagem (SS). Outro, denominado complexo laranja, que parece preceder a colonização do complexo vermelho, foi dividido em 2 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 gracilis* 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. Esses seriam os colonizadores primários da superfície dental. 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 *Selenomonas noxia*, As espécies *Selenomonas noxia* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo b não se correlacionaram com nenhuma outra.

Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* sorotipos 1 e 2) foram agrupadas no complexo azul (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002).

## 1.2 Terapia periodontal

Apesar do nosso conhecimento sobre a composição dos biofilmes supra e sugengivais ter crescido muito nos últimos anos, terapias mais efetivas e específicas para as infecções periodontais ainda estão sendo estudadas. Os principais objetivos da terapia periodontal são melhorar os parâmetros clínicos e manter os níveis de inserção estáveis ao longo do tempo. Atualmente, já está bem definido que esses objetivos somente são alcançados quando a terapia utilizada é capaz de reduzir os níveis e as proporções das espécies bacterianas patogênicas em toda a cavidade oral e permitir a sua subsequente recolonização por uma microbiota compatível com saúde.

A raspagem e alisamento radicular (RAR) é a terapia periodontal mais comumente utilizada para o tratamento periodontal. Apesar de levar, na maioria das vezes, a uma melhora nos parâmetros clínicos periodontais, a RAR é, muitas vezes, insuficiente para modificar profundamente o perfil bacteriano patogênico para um perfil relacionado à saúde periodontal, principalmente em casos de doenças mais severas ou associadas a fatores de risco, como o fumo (HAFFAJEE et al., 1997; CUGINI et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; MATARAZZO et al., 2008). Sendo assim, outras terapias coadjuvantes à RAR, como os antibióticos sistêmicos e o controle sistemático da placa supragengival, têm sido propostos com o objetivo de potencializar os efeitos clínicos e microbiológicos desta forma de terapia (van WINKELHOFF et al., 1997; FERES et al., 2001; GONÇALVES, 2000; MOEINTAGHAVI et al., 2007; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000b; HERRERA et al., 2002; CARVALHO et al., 2004 e 2005; TELLES et al., 2006; FAVERI et al., 2006b; MOREIRA & FERES FILHO, 2007; HAFFAJEE et al. 2003a, 2007 e 2008; HERRERA et al., 2008; MATARAZZO et al., 2008; FERES et al., 2009).

### 1.2.1 Antibioticoterapia no tratamento periodontal

#### 1.2.1.1 *Histórico*

Segundo a definição original os antibióticos são substâncias produzidas por organismos vivos, como fungos e bactérias, que têm a função de eliminar ou inibir o crescimento de outros microrganismos. Porém, atualmente, drogas

sintéticas (ex.: metronidazol) e semi-sintéticas (ex.: doxiciclina, minociclina e amoxicilina (AMX)) com ação antimicrobiana também são genericamente chamadas de antibióticos. De acordo com a ação farmacológica, os antibióticos são classificados como bactericidas, quando provocam a morte dos microrganismos suscetíveis; ou bacteriostáticos, quando inibem o crescimento e a multiplicação das espécies sensíveis. De acordo com os mecanismos de ação, os antibióticos podem ser divididos em quatro grupos: os que atuam sobre a síntese da parede celular, de proteínas, de ácidos nucleicos e da membrana citoplasmática (MONTGOMERY EH, 2000).

Os estudos clínicos sobre o efeito dos antibióticos nas doenças periodontais iniciaram-se na década de 70, quando Slots et al. (1979) observaram a ação positiva da tetraciclina hidrocloreídica no tratamento da periodontite agressiva localizada em indivíduos jovens. Foi observado um efeito adicional à RAR quando a tetraciclina foi utilizada em conjunto com essa terapia, incluindo uma alteração mais benéfica na composição da microbiota subgingival, além de regeneração do osso alveolar em várias bolsas infraósseas. Depois disso, outros estudos também relataram benefícios clínicos e microbiológicos com a utilização das tetraciclinas no tratamento das periodontites agressivas (WILLIAMS et al., 1979; GENCO et al., 1981; LINDHE, 1981; LINDHE & LILJENBERG, 1984; NOVAK et al., 1988; 1991). Posteriormente, os antibióticos começaram também a ser estudados no tratamento de outras formas de periodontite, como as periodontites crônicas.

#### *1.2.1.2 Metronidazol e Amoxicilina*

Um dos antibióticos mais promissores para o tratamento de indivíduos com periodontite crônica é o metronidazol (MTZ) que é uma droga sintética, derivada do nitroimidazol, com atividade bactericida e protozoaricida. O MTZ penetra nas células bacterianas por difusão passiva e gera metabólitos tóxicos que interagem com o DNA e outras macromoléculas bacterianas, causando a morte celular. Apesar de penetrar em todas as células bacterianas a porção nitro da droga sofre redução enzimática, e conseqüente ativação, apenas nas bactérias anaeróbias estritas. O MTZ é geralmente bem tolerado, mas alguns

efeitos adversos podem ocorrer como náusea, dor epigástrica, estomatite, língua saburosa negra e gosto metálico na boca (MONTGOMERY EH, 2000).

Shinn (1962) foi o primeiro a utilizar o MTZ em odontologia após observar um alívio casual nos sintomas da gengivite ulcerativa necrosante aguda (GUNA) em uma mulher que utilizou o MTZ para o tratamento de tricomoníase vaginal. A partir de então esse medicamento começou a ser mais utilizado para o tratamento da GUNA (DAVIES et al., 1964; GLENWRIGHT & SIDAWAY, 1966; LOESCHE et al., 1982). Recentemente, Pahkla et al. (2005) avaliaram a concentração do MTZ sistêmico (500mg, 2 ou 3 x dia, por pelo menos 2 dias) no plasma, saliva e fluído gengival, em indivíduos com periodontite crônica generalizada avançada e observaram boa penetração desta droga no fluído gengival e na saliva. As concentrações observadas no fluído eram similares às observadas no plasma, sugerindo uma farmacocinética favorável desse medicamento para sua utilização no tratamento da doença periodontal.

A vantagem do MTZ no tratamento da periodontite crônica é seu espectro de ação direcionado às espécies bacterianas anaeróbias estritas, como é o caso dos 3 patógenos do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*). Uma série de estudos iniciados por Loesche e colaboradores no final da década de 1980 sugeriu a redução da necessidade de se realizar procedimento cirúrgico no tratamento periodontal quando indivíduos com periodontite crônica eram tratados com MTZ sistêmico. Os autores observaram que o MTZ, na dosagem de 750mg a 1 g por dia, administrado por 14 dias associado à terapia mecânica, diminuía em até 93% o número de dentes com necessidade de tratamento cirúrgico, e em até 81% o número de dentes com indicação de extração por doença periodontal (LOESCHE et al., 1987, 1991, 1992, 1996, 2002 e 2005). Os efeitos do MTZ nos diversos parâmetros clínicos periodontais, como redução na profundidade de sondagem e ganho de inserção, foram estudados por diferentes grupos de pesquisa. De forma geral, a maioria dos estudos que associaram o MTZ à RAR no tratamento da periodontite crônica mostrou resultados clínicos melhores do que os obtidos somente com a terapia mecânica (JOYSTON-BECHAL et al., 1986; LOESCHE et al., 1992; WINKEL et al., 1997; ELTER et al., 1997; FERES, 1999a; HAFFAJEE et al., 2003b e 2007; CARVALHO et al., 2004,

MATARAZZO et al., 2008). Diversos estudos sugerem que o MTZ é mais efetivo em sítios profundos do que em sítios rasos (LOESCHE et al., 1981; CLARK et al., 1983; JOYSTON-BECHAL et al., 1984,1986; LOESCHE et al., 1984; STERRY et al., 1985; CARVALHO et al., 2004; HAFFAJEE et al., 2007). Elter et al. (1997) em uma meta-análise, concluíram que a combinação de MTZ e RAR proporciona melhores resultados clínicos do que a RAR sozinha, em casos de indivíduos que apresentam bolsas com profundidade de sondagem  $\geq$  4mm. Por outro lado, Feres, (1999a) e Feres et al., (2001) observaram benefícios desta terapia também em sítios intermediários (PS entre 4-6 mm).

Em relação às alterações microbiológicas alguns estudos também avaliaram os efeitos do MTZ na composição da microbiota subgingival em indivíduos com periodontite crônica não-fumantes (GOODSON & FERES, 1999; FERES et al., 2001; ROONEY et al., 2002; CARVALHO et al., 2005; EHMKE et al., 2005; TELES et al., 2006; MOENTAGHAVI et al., 2007; HAFFAJEE et al., 2008) ou fumantes (PALMER et al., 1999; SÖDER et al., 1999; WINKEL et al., 2001; PAHKLA et al., 2006 e MATARAZZO et al., 2008).

Haffajee et al., (2008) observaram alterações mais positivas no perfil microbiológico em indivíduos com periodontite crônica que receberam MTZ ou azitromicina sistêmicos, superiores às observadas com RAR somente. Os autores acompanharam por um período de um ano, indivíduos portadores de periodontite crônica submetidos à terapia mecânica apenas ou combinada ao metronidazol sistêmico (250mg, 3 x ao dia/ 14 dias), azitromicina sistêmica (500mg, 1 x ao dia/ 3 dias) ou doxiciclina em baixa dosagem (20mg, 2 x ao dia/ 3 meses).

A amoxicilina (AMX) pertence ao grupo das penicilinas. Esses antibióticos são bactericidas e atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana e levam conseqüentemente à morte do microrganismo. A AMX tem um amplo espectro de atividade, atuando sobre espécies anaeróbias estritas e facultativas (WALKER et al., 1985; KULIK et al., 2008), e também sobre cocos e bacilos Gram-negativos e Gram-positivos (MONTGOMERY EH, 2000). Porém, os estudos que avaliaram o efeito desse antibiótico combinado à RAR no tratamento da doença periodontal mostraram apenas discretas vantagem sobre a terapia mecânica sozinha (HELOVUO & PAUNIO, 1989; FERES et al.,

2001). Logo, a AMX não tem sido o antibiótico de primeira escolha para o tratamento das infecções periodontais.

Feres et al. (2001) compararam diretamente os efeitos da AMX ou do MTZ na composição da microbiota subgengival de indivíduos com periodontite crônica. Os voluntários receberam RAR associada ao MTZ (250 mg 3 x dia) ou à AMX (500mg 3 x dia), ambos por 14 dias. Foi observado que os níveis e as proporções de *T. forsythia*, *P. gingivalis* e *T. denticola* reduziram drasticamente durante a administração dos antibióticos e se mantiveram mais baixas que no tempo inicial em 1 ano pós-terapia, principalmente no grupo que recebeu o MTZ. Além disso, o MTZ afetou muito pouco as espécies consideradas benéficas, como *Actinomyces*, *Streptococcus* e *Capnocytophaga*. O grupo que recebeu AMX também apresentou redução dos níveis das 3 espécies do complexo vermelho; no entanto, após 1 ano ocorreu uma maior recolonização desses patógenos, principalmente das espécies *T. forsythia* e *T. denticola*. Além disso, houve uma redução na proporção dos *Actinomyces*, no grupo da AMX, que são espécies intimamente relacionadas à saúde periodontal.

#### 1.2.1.3 *Metronidazol associado à amoxicilina*

A associação do MTZ e da AMX à terapia mecânica foi sugerida pela primeira vez por van Winkelhoff et al. (1989 e 1992). Esse grupo de pesquisadores observou significativa redução nos níveis de *A. actinomycetemcomitans* e na profundidade de sondagem, além de ganho de inserção, na maioria dos indivíduos que receberam RAR associada ao MTZ (250 mg, 3x/dia) e AMX (375 mg, 3x/dia), ambos por 7 dias (van WINKELHOFF et al., 1992). Após esses estudos iniciais, diversos autores avaliaram os efeitos clínicos e microbiológicos dessa combinação de terapias no tratamento da periodontite crônica (PAVICIC et al., 1994; FLEMMIG et al., 1998; BERGLUNDH et al., 1998; WINKEL et al., 2001; ROONEY et al., 2002; HERRERA et al., 2002; MOMBELLI et al., 2005; EHMKE et al., 2005; PAHKLA et al., 2006; MOEINTAGHAVI et al., 2007; DANNEWITZ et al., 2007; MATARAZZO et al., 2008; CIONCA et al., 2009). Recentemente, Cionca et al. (2009), avaliaram os benefícios clínicos ocorridos em pacientes com



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

Ao nosso conhecimento, apenas dois estudos até hoje compararam os efeitos da RAR associada ao MTZ ou ao MTZ e à AMX no tratamento da periodontite crônica (ROONEY et al., 2002; MATARAZZO et al., 2008), sendo que apenas um deles, realizado em indivíduos fumantes comparou as alterações ocorridas no perfil microbiológico subgengival após a utilização desses dois protocolos terapêuticos (MATARAZZO et al., 2008). O estudo de Matarazzo et al. (2008) avaliou parâmetros clínicos e 40 espécies bacterianas subgengivais em 43 indivíduos fumantes com periodontite crônica. Os autores observaram que aqueles que receberam RAR associada ao MTZ e à AMX (MTZ 400mg, 3 x dia por 14 dias; AMX 500mg, 3 x dia por 14 dias) mostraram a maior redução nas contagens e proporções de espécies consideradas patogênicas, como as do complexo vermelho. Além disso, esses indivíduos tiveram os aumentos mais significantes nas espécies compatíveis com saúde, quando comparados com indivíduos que receberam apenas RAR ou RAR associada ao MTZ. Vale destacar que, até o momento, a comparação dos efeitos desses dois protocolos terapêuticos no perfil microbiológico subgengival de indivíduos com periodontite crônica não-fumantes ainda não foi realizada.

### 1.2.2 Controle mecânico do biofilme supragengival

A idéia de introduzir o controle rigoroso profissional da placa supragengival como parte ativa da terapia periodontal foi inicialmente descrita entre os anos 1980 e 1990. Diferentes grupos de pesquisadores sugeriram que a remoção da placa supragengival duas vezes por semana por longos períodos levaria a benefícios clínicos e microbiológicos na terapia periodontal (NYMAN

et al., 1975; ROSLING et al., 1976; LINDHE et al., 1982; WESTFELT et al., 1983 e MAGNUSSON et al., 1984).

Posteriormente, Hellström et al. (1996), realizaram uma pesquisa com 12 indivíduos portadores de periodontite moderada à avançada, que receberam instrução de higiene oral e profilaxia profissional 2 a 3 vezes por semana durante 30 semanas. Foram realizadas avaliações clínicas e microbiológicas para testar a hipótese de que o controle do biofilme supragengival poderia afetar a composição do biofilme subgengival. Os autores observaram redução nos níveis de *P. gingivalis* tanto nas regiões de furca quanto em bolsas supra e infraósseas. Houve também redução no percentual de sítios com PS entre 4 e 6 mm e aumento daqueles sítios com PS  $\leq$  3mm. Ximenez-Fyvie et al. (2000a,b) investigaram os efeitos da remoção da placa supragengival (RPS) na composição da placa subgengival em indivíduos com periodontite crônica leve, utilizando a técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Foi avaliado o efeito da remoção profissional de placa supragengival após a RAR, realizada semanalmente por um período de 3 meses. Os resultados demonstraram que o controle de placa sistemático durante os três primeiros meses de manutenção pós-terapia periodontal apresenta efeitos benéficos de longa duração sobre a microbiota da placa subgengival. Os níveis de todas as 40 espécies microbianas avaliadas foram reduzidos aos 6 meses pós-terapia. Surpreendentemente, o controle profissional de placa supragengival levou a uma redução na proporção de diversos patógenos periodontais na placa subgengival. As espécies mais significativamente reduzidas foram o *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*. É interessante observar que aos 12 meses de avaliação pós-terapia, ou seja, 9 meses após a suspensão do controle de placa profissional semanal, o perfil microbiológico destes pacientes ainda era semelhante ao perfil microbiológico observado em um grupo de 22 pacientes com saúde periodontal, que nunca havia sido submetido a tratamento periodontal.

Mais recentemente, Carvalho (2002) e Carvalho et al. (2004 e 2005) realizaram um estudo aleatorizado, duplo cego, placebo-controlado, com 45 indivíduos portadores de periodontite crônica avançada generalizada. Os pacientes foram divididos em 4 grupos experimentais, e receberam RAR somente ou associada à terapia com antibióticos sistêmicos (MTZ 400mg, 3 x

dia por 10 dias), complementada ou não com RPS semanal por 3 meses. Foi observado que o grupo que recebeu as 3 terapias associadas foi o que apresentou melhores resultados clínicos (principalmente nos sítios com PS  $\geq$  7mm) e microbiológicos. Em todos os grupos de tratamento ocorreu redução significativa das espécies bacterianas do complexo vermelho; porém, no grupo que recebeu as três terapias, houve também uma maior redução das espécies do complexo laranja. Estas alterações foram observadas logo após a terapia e se mantiveram até um ano (CARVALHO, 2002). Resultados semelhantes foram descritos por Haffajee et al. (2003a) na população norte americana. Hugoson et al. (2007) avaliaram cerca de 400 indivíduos por 3 anos que foram incluídos em diferentes protocolos de controle do biofilme supragengival. Os autores observaram que todos os indivíduos que participaram de algum desses programas mostraram menores índices de gengivite e de sítios com sangramento gengival do que os indivíduos que não participaram.

### 1.2.3 Controle químico do biofilme supragengival

Os resultados benéficos observados quando a remoção profissional do biofilme supragengival é realizada durante a fase ativa da terapia periodontal são animadores (HELLSTRÖM et al., 1996; XIMENEZ-FYVIE et al., 2000b; CARVALHO et al., 2004 e 2005). Porém, manter o paciente retornando semanalmente ao consultório odontológico para realizar o procedimento de remoção mecânica do biofilme é muitas vezes uma prática difícil de ser realizada. A substituição do controle de placa profissional semanal pelo bochecho diário com digluconato de clorexidina (CLX) foi sugerido como uma boa alternativa terapêutica em dois estudos recentes do nosso grupo de pesquisa. (FAVERI et al., 2006b e FERES et al., 2009).

A CLX é considerada como o antisséptico de escolha para o controle de placa supragengival por possuir amplo espectro de ação e excelente efeito antimicrobiano sobre as bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus presentes na cavidade oral (LOESCHE, 1979; GJERMO, 1989; ALBANDAR et al., 1994; SEKINO et al., 2003). Embora alguns efeitos colaterais possam ser observados com o uso prolongado da CLX como o surgimento de manchas nos dentes, mucosas, língua e restaurações, além de

perda do paladar e sensação de queimação das mucosas orais, todas estas alterações são de fácil resolução e reversíveis após o fim do tratamento e, além disso, os benefícios terapêuticos são de grande valia e justificam o seu uso (ERNST et al.,1998; MC COY et al., 2008). Com base nesses conceitos, Favari et al. (2006b) conduziram um estudo clínico controlado para avaliar o efeito de bochechos com CLX durante e após o tratamento periodontal convencional. Os autores observaram melhores resultados clínicos e microbiológicos no tratamento de pacientes com periodontite crônica com a combinação de RAR e bochechos de CLX a 0,12%, duas vezes ao dia por 2 meses, quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas RAR. Quando os sítios periodontais foram categorizados de acordo com a PS inicial, os benefícios clínicos da associação das terapias foram especialmente notados nos sítios intermediários e profundos (PS entre 4 e 6mm e > 6mm, respectivamente). Esses sítios apresentaram as maiores reduções nas médias de PS e no percentual de sítios com sangramento à sondagem, além de ganho clínico de inserção. Mais recentemente, Feres et al. (2009) observaram que a associação da RAR à CLX ou à RPS leva a benefícios clínicos e microbiológicos superiores à RAR sozinha. De acordo com os autores, o controle do biofilme supragengival previne a recolonização dos sítios já tratados e reduz a inflamação nos tecidos periodontais adjacentes, diminui assim a nutrição subgengival necessária para a multiplicação de certos patógenos periodontais. Foi sugerido também que a terapia que associou CLX alcançou resultados clínicos e na composição da microbiota subgengival superiores aos observados com RPS, provavelmente pelo fato do antisséptico atingir locais que atuam como reservatórios de periodontopatógenos que não são afetados pela remoção mecânica da placa supragengival, como língua e bochechas (MAGER et al., 2003).

## 2. JUSTIFICATIVA

A RAR, apesar de ser uma terapia efetiva para grande parte dos indivíduos com periodontite crônica, possui limitações para o tratamento de indivíduos com doença avançada e generalizada. A principal limitação diz respeito à ineficácia da RAR em alterar profundamente o perfil microbiológico associado à doença para um perfil compatível com saúde periodontal, principalmente em casos mais avançados. Logo, é fundamental que se realizem estudos clínicos controlados associando-se outras terapias à RAR com a finalidade de se traçar tratamentos mais efetivos para esses indivíduos. Neste sentido a avaliação das alterações microbiológicas decorrentes desses tratamentos é fundamental, pois somente diante dessas informações é que poderemos entender os efeitos de cada terapia e prosseguir otimizando suas aplicações. Até o presente momento as terapias que mostraram os maiores benefícios quando associadas à RAR para o tratamento da periodontite crônica foram o MTZ somente ou em combinação com a AMX, além do controle químico da placa supragengival (CLX 0.12%). Porém, poucos estudos avaliaram as alterações microbiológicas decorrentes desses tratamentos. Apenas um estudo, do nosso grupo de pesquisa, avaliou os efeitos da associação da RAR com MTZ ou com MTZ e AMX (MATARAZZO et al., 2008) no perfil microbiológico, em fumantes com periodontite crônica. Nada está descrito na literatura para os não-fumantes. Da mesma forma, poucos estudos avaliaram as alterações no perfil microbiológico subgengival quando o controle sistemático profissional do biofilme supragengival (XIMENEZ-FYVIE et al., 2000b; HAFFAJEE et al., 2003a; CARVALHO et al., 2005) ou químico (FERES et al., 2009) foram realizados durante a fase ativa do tratamento periodontal. Outro ponto importante a ser estudado são os efeitos clínicos, e principalmente, na composição da microbiota subgengival das diferentes combinações dessas terapias.

### **3. PROPOSIÇÃO**

Avaliar e comparar os efeitos da terapia de RAR associada ou não ao MTZ ou ao MTZ e à AMX, com ou sem o controle químico do biofilme supragengival por meio do bochecho com CLX na composição da microbiota subgengival, em indivíduos com periodontite crônica, testando a hipótese de que quimioterápicos, locais ou sistêmicos, contribuem para melhorar os efeitos microbiológicos da terapia de RAR em portadores de periodontite crônica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cálculo da potência

O tamanho amostral ideal para garantir uma potência adequada a esse estudo clínico controlado foi calculado com base nos seguintes parâmetros: a) Clínicos: diferenças de pelo menos 1 mm no NIC entre os grupos experimentais para sítios com PS > 6 mm. O desvio padrão estabelecido para essas alterações foi de 1.0 mm; b) Microbiológicos: diferenças de pelo menos 3.5% na proporção de complexo vermelho entre os grupos experimentais. O desvio padrão estabelecido foi de 3.4%.

Os desvios padrões clínico e microbiológico foram estabelecidos com base em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (FAVERI et al., 2006b; MATARAZZO et al., 2008, FERES et al., 2009) e foi utilizado  $\alpha=0.05$ . Foi encontrada uma potência superior a 80% para uma amostragem de 15 pacientes, tanto para a variável clínica quanto para a microbiológica. Considerando-se uma média de desistência de aproximadamente 20%, optou-se por incluir 20 indivíduos por grupo.

### 4.2 Seleção dos indivíduos

A seleção de indivíduos foi realizada por dois mestrandos em Odontologia, área de concentração em periodontia, sob supervisão dos professores da disciplina, após a apreciação e aprovação (ANEXO C) do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos (UnG). Aproximadamente 800 indivíduos que compareceram à Clínica Odontológica da UnG foram triados para que 120 indivíduos portadores de periodontite crônica fossem incluídos neste estudo. Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo, de seus riscos e benefícios, incluindo os tipos de medições clínicas e terapias a serem utilizadas. A participação na pesquisa foi voluntária e os 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.

### **4.3 Critérios de inclusão e exclusão**

#### Critérios de inclusão

Para a inclusão no estudo, foram selecionados indivíduos com periodontite crônica generalizada, de acordo com os critérios a seguir:

- Voluntários portadores de periodontite crônica;
- Idade igual ou superior a 30 anos;
- Possuir um mínimo de 15 dentes, excluindo-se os terceiros molares e os com indicação de extração;
- Mínimo de 6 dentes com pelo menos 1 sítio interproximal, não contíguo, com PS entre 5 e 7 mm e NCI entre 5 e 10 mm, preferencialmente distribuídos em sextantes distintos.

#### Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Fumantes e ex-fumantes há menos de 5 anos.
- Gestantes ou lactantes;
- Histórico de tratamento periodontal prévio nos últimos seis meses;
- Histórico de antibioticoterapia nos últimos seis meses;
- Histórico de uso de antissépticos orais nos últimos 6 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 e/ou à CLX;
- Reabilitações protéticas extensas.

### **4.4 Delineamento experimental**

No início deste estudo duplo cego, aleatorizado, placebo controlado, todos os indivíduos foram submetidos à anamnese e exame clínico periodontal. Em seguida, um pesquisador, não envolvido diretamente no estudo, fez a distribuição aleatória dos indivíduos por meio de uma tabela de números equiprováveis nos seguintes grupos terapêuticos (n=20 por grupo):



- **Grupo controle (RAR): RAR + AMX sistêmica placebo (500mg) + MTZ placebo (400mg) 3 vezes ao dia durante 14 dias + bochecho com CLX 0,12% placebo 2 vezes ao dia, durante 2 meses;**

- **Grupo teste 1 (CLX): RAR + bochecho com CLX 0,12% 2 vezes ao dia, durante 2 meses + MTZ (400mg) placebo e AMX placebo (500mg) 3 vezes ao dia, durante 14 dias;**

- **Grupo teste 2 (MTZ): RAR + MTZ sistêmico (400mg), 3 vezes ao dia, durante 14 dias + AMX (500mg) placebo 3 vezes ao dia, durante 14 dias + bochecho com CLX 0,12% placebo 2 vezes ao dia, durante 2 meses;**

- **Grupo teste 3 (MTZ+CLX): RAR + MTZ (400mg) sistêmico + bochecho com CLX 0,12% 2 vezes ao dia, durante 2 meses + AMX (500mg) placebo 3 vezes ao dia, durante 14 dias;**

- **Grupo teste 4 (MTZ+AMX): RAR + MTZ (400mg) e AMX (500mg) sistêmicos 3 vezes ao dia, durante 14 + bochecho com CLX 0,12% placebo 2 vezes ao dia, durante 2 meses;**

- **Grupo teste 5 (MTZ+AMX+CLX): RAR + MTZ (400mg) e AMX (500mg) sistêmicos 3 vezes ao dia, durante 14 dias + bochecho com CLX 0,12% 2 vezes ao dia, durante 2 meses.**

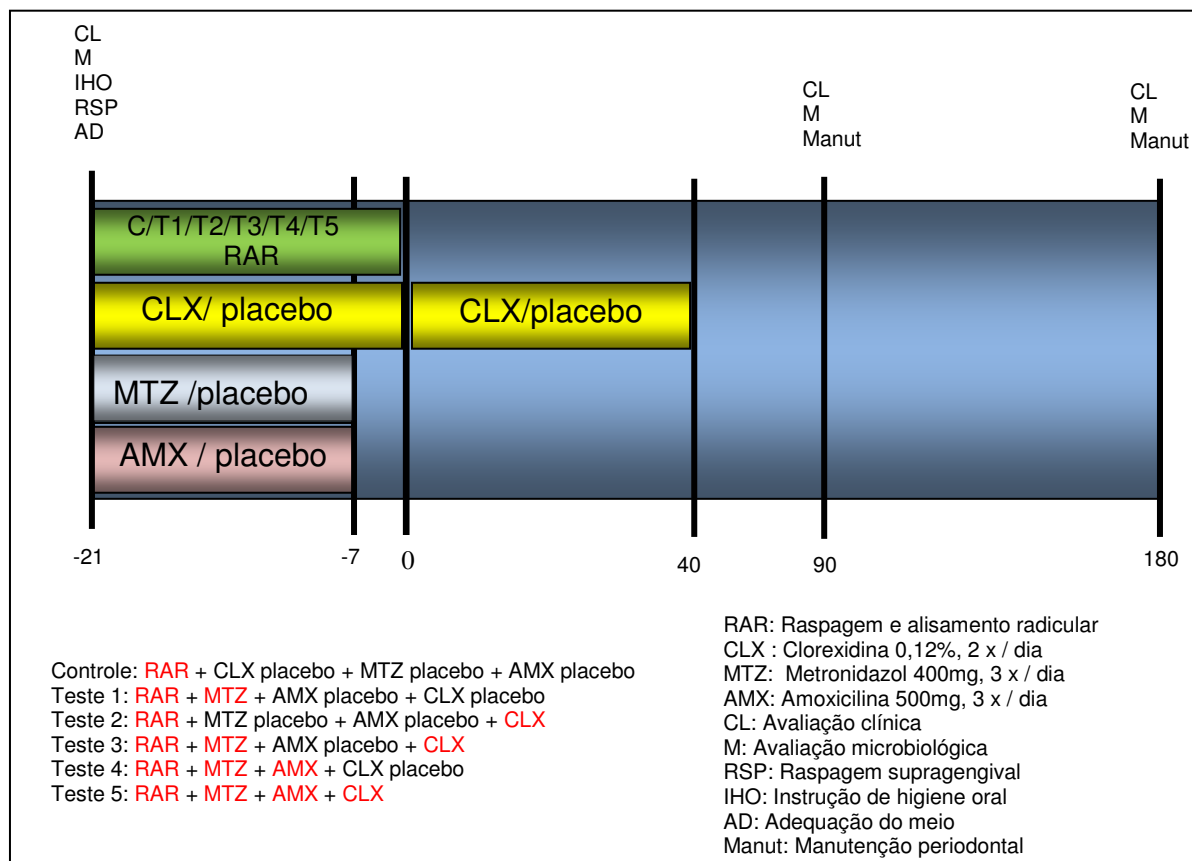
A antibioticoterapia (MTZ, AMX e placebos) e o controle químico (CLX e placebo) foram iniciados no mesmo dia da terapia básica de RAR, que foi realizada em 6 sessões e finalizada em 21 dias. A medicação sistêmica durou 14 dias, enquanto o controle químico foi utilizado por 2 meses. As avaliações clínicas e microbiológicas foram repetidas nas consultas de reavaliação 3 meses e 6 meses após o término do tratamento. O protocolo experimental está apresentado na Figura 1.

## **4.5 Procedimentos terapêuticos**

### **4.5.1 Terapia periodontal básica**

Após o registro das medidas clínicas, todos os indivíduos foram submetidos a uma ou duas sessões de adequação do meio bucal que incluíam

instrução de higiene bucal (IHB), raspagem supragengival de todos os dentes (RSP) com instrumentos manuais, remoção de excesso de restaurações, selamento provisório das lesões cáries cavitadas, curativos endodônticos e exodontias.



**Figura 1.** Delineamento experimental

Durante as sessões de IHB, os indivíduos foram orientados a utilizar escovas com cerdas macias, juntamente com creme dental Colgate Total® (Anacol Ind. E Com. Ltda - Kolynos do Brasil – Colgate Palmolive Co., São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Em seguida, os indivíduos receberam seis sessões de RAR com curetas Gracey, números 5/6, 7/8, 11/12 e 13/14 (Hufriedy) sob anestesia local. Estas sessões de RAR foram realizadas por dois alunos treinados do Mestrado em Odontologia da Universidade Guarulhos, (Geisla M. S. Soares e Juliana A. Mendes) com duração de aproximadamente

1 hora e foram finalizadas em 21 dias, sendo que os sítios mais comprometidos foram tratados nos primeiros 14 dias.

Os dois examinadores realizaram os exames clínicos e também a terapia de RAR, porém aquele examinador responsável pela execução da RAR não realizava os exames no mesmo indivíduo.

As necessidades adicionais de tratamento odontológico, quando observadas, foram encaminhadas às demais disciplinas da clínica odontológica da própria universidade.

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

Indivíduos dos grupos testes (MTZ, MTZ+CLX, MTZ+AMX e MTZ+AMX+CLX) 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 a terapia periodontal básica. Os pacientes 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 pacientes 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 indivíduos foram orientados a retornar na próxima semana 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. Após o término do período de administração da droga e/ou placebo, os indivíduos responderam a um questionário (ANEXO A) sobre possíveis reações adversas da medicação.

#### 4.5.3 Administração de bochecho com CLX e placebo.

Os bochechos (solução de digluconato de clorexidina 0,12% ou solução placebo) foram realizados 2 vezes ao dia com 15 ml da solução, 40 minutos após a escovação. O início do uso da CLX ou placebo ocorreu juntamente com o início da RAR e durou 2 meses. As soluções foram manipuladas especialmente para o estudo, na farmácia de manipulação Pharmédica (São Paulo, SP, Brasil) e acondicionadas em frascos de 210 ml, idênticos e codificados. A solução placebo possuía a mesma apresentação, cor e sabor da substância ativa - solução de digluconato de CLX a 0,12%. Os indivíduos receberam 1 frasco por semana contendo a solução de CLX ou o placebo. Após o término do produto, os pacientes foram orientados a trazerem à clínica de odontologia da UnG o frasco vazio para a retirada de um novo frasco, para controle da cooperação.

Ao final do período de bochecho com CLX ou placebo (2 meses) os indivíduos responderam a um questionário (ANEXO B) sobre possíveis reações adversas do medicamento.

#### 4.6 Avaliação clínico-periodontal

O exame clínico-periodontal foi efetuado no início do estudo com o objetivo de realizar o diagnóstico do indivíduo. Dois 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 (profundidade de sondagem e nível clínico de inserção). 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 no início do estudo, 3 meses e 6 meses pós terapia, em 6 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.

## **4.7 Avaliação microbiológica**

### **4.7.1 Seleção dos sítios-testes**

Foram selecionados nove sítios em cada voluntário, distribuídos uniformemente de acordo com a profundidade de sondagem inicial nas seguintes categorias (3 sítios por categoria): rasas ( $PS \leq 3\text{mm}$ ), intermediárias ( $PS 4-6\text{ mm}$ ), e profundas ( $PS \geq 7\text{mm}$ ). Quando um dos 3 sítios profundos não

foi encontrado, o mesmo foi substituído por sítio intermediário. Estes sítios estavam localizados em faces dentais interproximais não-contíguas, e preferencialmente distribuídos entre os quatro quadrantes. Sítios localizados em dentes com próteses mal adaptadas, lesão de cárie extensa e/ou lesão endo-periodontal não foram utilizados. Amostras de biofilme foram coletadas no início do estudo, 3 e 6 meses pós-terapia.

#### 4.7.2 Coleta das amostras de biofilme subgingival

Após a remoção de cálculo e biofilme supragengivais, as amostras de biofilme subgingival foram retiradas com curetas Gracey do tipo minifive 11-12 esterilizadas, posicionadas na porção mais apical dos sítios e em um único golpe de raspagem no sentido ápico-coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos individuais contendo 150µL de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 mM EDTA (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil), pH 7,6, e a estas foi acrescentado 100µL de NaOH (Labsynth) a 0,5M para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Esses tubos plásticos foram previamente identificados com o código do indivíduo, data e sítio, e após a coleta foram armazenados sob refrigeração a -20°C até as amostras serem analisadas por meio da técnica do *checkerboard DNA-DNA hybridization* para 40 cepas bacterianas no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II da UnG.

#### 4.7.3 Cepas bacterianas e condições de crescimento

A lista das 40 cepas bacterianas utilizadas neste estudo para o preparo das sondas de DNA está apresentada na Tabela 1. Todas as cepas foram adquiridas liofilizadas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA) ou do Forsyth Institute (Boston, MA, EUA). O conteúdo liofilizado foi reidratado em caldo para crescimento de *Mycoplasma* (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e cultivado em ágar-triptose de soja (Difco) contendo 5% de

sangue desfibrinado de ovelha (BBL, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, MD, EUA) a 35°C sob condição de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>). 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 desfibrinado de ovelha e 10 µg/mL de ácido N-acetil murâmico (NAM) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA); enquanto *P. gingivalis* cresceu em um meio similar, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovelha, 0,3 µg/mL de menadiona (Sigma) e 5 µg/mL de hemina (Sigma). As espécies *T. denticola* e *Treponema socranskii* foram cultivados em caldo para crescimento de *Mycoplasma* suplementado com 1 mg/mL de glicose (Sigma), 400 µg/mL de niacinamida (Sigma), 150 µg/mL de espermina tetraidroclorídrica (Sigma), 20 µg/mL de isobutirato de sódio (ICN, Costa Mesa, CA, EUA), 1 mg/mL de L-cisteína (Sigma), 5 µg/mL de tiamina pirofosfato (Sigma) e 0,5% de soro bovino (Laborclin, São José dos Pinhais, PR, Brasil).

#### 4.7.4 Isolamento do DNA e preparo das sondas

As cepas bacterianas foram cultivadas anaerobicamente na superfície de ágar-sangue, com exceção das 2 espécies de espiroquetas, que foram cultivadas em caldo, por 3 a 7 dias. As colônias foram raspadas e depositadas em tubos plásticos para microcentrifuga de 1,5 mL contendo 1 mL de solução TE (pH 7,6). As células foram lavadas 2 vezes por centrifugação na solução-tampão de TE a 3.500xg por 10 minutos. Em seguida, as cepas gram-negativas foram novamente suspensas e lisadas com SDS (dodecilsulfato de sódio, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, Labsynth) a 10% e proteinase K (Sigma) em uma concentração de 20 mg/mL. As cepas de bactérias gram-positivas foram lisadas em 150µL de uma mistura enzimática contendo 15 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5 mg/mL de acromopeptidase (Sigma) em solução tampão TE (pH 8,0).

O DNA foi isolado e purificado como descrito por Smith et al. (1989). As sondas genômicas foram preparadas para cada uma das 40 espécies pela marcação de 1 µg do DNA bacteriano com digoxigenina, por meio do *random primer digoxigenin labeling kit* (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, EUA), de acordo com o método descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As

espécies avaliadas foram selecionadas segundo suas associações com diferentes tipos de doenças ou saúde periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1994c; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005).

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

| Espécies                           | Cepas              | Espécies  | Cepas              |
|------------------------------------|--------------------|---|--------------------|
| <b>Complexo Azul</b>               |                    | <b>Complexo Laranja (cont.)</b>                       |                    |
| <i>Actinomyces gerencseriae</i>    | 23860 <sup>a</sup> | <i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>nucleatum</i>   | 25586 <sup>a</sup> |
| <i>Actinomyces israelii</i>        | 12102 <sup>a</sup> | <i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>polymorphum</i> | 10953 <sup>a</sup> |
| <i>Actinomyces naeslundii</i> I    | 12104 <sup>a</sup> | <i>Fusobacterium nucleatum</i> ssp <i>vincentii</i>   | 49256 <sup>a</sup> |
| <i>Actinomyces naeslundii</i> II   | 43146 <sup>a</sup> | <i>Fusobacterium periodonticum</i>                    | 33693 <sup>a</sup> |
| <b>Complexo Roxo</b>               |                    | <i>Parvimonas micra</i>                               | 33270 <sup>a</sup> |
| <i>Actinomyces odontolyticus</i>   | 17929 <sup>a</sup> | <i>Prevotella intermedia</i>                          | 25611 <sup>a</sup> |
| <i>Veillonella parvula</i>         | 10790 <sup>a</sup> | <i>Prevotella nigrescens</i>                          | 33563 <sup>a</sup> |
| <b>Complexo Amarelo</b>            |                    | <i>Streptococcus constellatus</i>                     | 27823 <sup>a</sup> |
| <i>Streptococcus gordonii</i>      | 10558 <sup>a</sup> | <b>Complexo Vermelho</b>                              |                    |
| <i>Streptococcus intermedius</i>   | 27335 <sup>a</sup> | <i>Tannerella forsythia</i>                           | 43037 <sup>a</sup> |
| <i>Streptococcus mitis</i>         | 49456 <sup>a</sup> | <i>Porphyromonas gingivalis</i>                       | 33277 <sup>a</sup> |
| <i>Streptococcus oralis</i>        | 35037 <sup>a</sup> | <i>Treponema denticola</i>                            | B1 <sup>b</sup>    |
| <i>Streptococcus sanguinis</i>     | 10556 <sup>a</sup> | <b>Outras Espécies</b>                                |                    |
| <b>Complexo Verde</b>              |                    | <i>Eubacterium saburreum</i>                          | 33271 <sup>a</sup> |
| <i>Aggregatibacter</i>             | 43718 <sup>a</sup> | <i>Gemella morbillorum</i>                            | 27824 <sup>a</sup> |
| <i>actinomycetemcomitans</i> a + b | 29523 <sup>a</sup> | <i>Leptotrichia buccalis</i>                          | 14201 <sup>a</sup> |
| <i>Capnocytophaga gingivalis</i>   | 33624 <sup>a</sup> | <i>Neisseria mucosa</i>                               | 19696 <sup>a</sup> |
| <i>Capnocytophaga ochracea</i>     | 33596 <sup>a</sup> | <i>Prevotella melaninogenica</i>                      | 25845 <sup>a</sup> |
| <i>Capnocytophaga sputigena</i>    | 33612 <sup>a</sup> | <i>Propionibacterium acnes</i> I + II                 | 11827 <sup>a</sup> |
| <i>Eikenella corrodens</i>         | 23834 <sup>a</sup> |   | 11828 <sup>a</sup> |
| <b>Complexo Laranja</b>            |                    | <i>Selenomonas noxia</i>                              | 43541 <sup>a</sup> |
| <i>Campylobacter gracilis</i>      | 33236 <sup>a</sup> | <i>Streptococcus anginosus</i>                        | 33397 <sup>a</sup> |
| <i>Campylobacter rectus</i>        | 33238 <sup>a</sup> | <i>Treponema socranskii</i>                           | S1 <sup>b</sup>    |
| <i>Campylobacter showae</i>        | 51146 <sup>a</sup> |   |                    |
| <i>Eubacterium nodatum</i>         | 33099 <sup>a</sup> |   |                    |

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



#### 4.7.5 Checkerboard DNA-DNA hybridization

As suspensões contidas nos tubos plásticos foram fervidas em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, neutralizadas pela adição de 0,8 ml de acetato de amônia a 5M. Cada suspensão de biofilme dental contendo o DNA livre foi depositada em uma das canaletas do *Minislot* 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA – Figura 2) e transferida para a membrana de *nylon* (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra). As duas últimas das 30 canaletas do *Minislot* foram ocupadas por controles contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas, nas concentrações correspondentes a  $10^5$  e  $10^6$  células, ou seja, 1 ng e 10 ng de DNA de cada espécie, respectivamente (SOCRANSKY et al., 1994c; HAFFAJEE et al., 1997). A membrana foi removida do *Minislot* 30 e o DNA nela concentrado foi fixado por aquecimento em forno a 120°C por 20 min. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por 1 hora, em uma solução contendo 50% formamida (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 1% caseína (Vetec), 5 x solução salina citratada (SSC) (1 x SSC= 150mM NaCl (Vetec), 15M de citrato de sódio (J.T.Baker, Edo. de Méx., México) , pH 7,0, 25mM de fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Labsynth) pH 6,5 e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Sigma). Em seguida, a membrana foi posicionada no *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA – Figura 3) com as linhas contendo o DNA das amostras e dos controles posicionadas perpendicularmente às canaletas do aparato. Em cada canaleta do *Miniblotter* 45 foi adicionada uma sonda de DNA, diluída a aproximadamente 20 ng/mL, em 130  $\mu\text{L}$  de solução de hibridização composta de 45% formamida, 5 x SSC, 20mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,5), 0,2 mg/ml de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano (Amersham) e 1% caseína. A hibridização ocorreu dentro de um período mínimo de 20 horas, a 42°C.

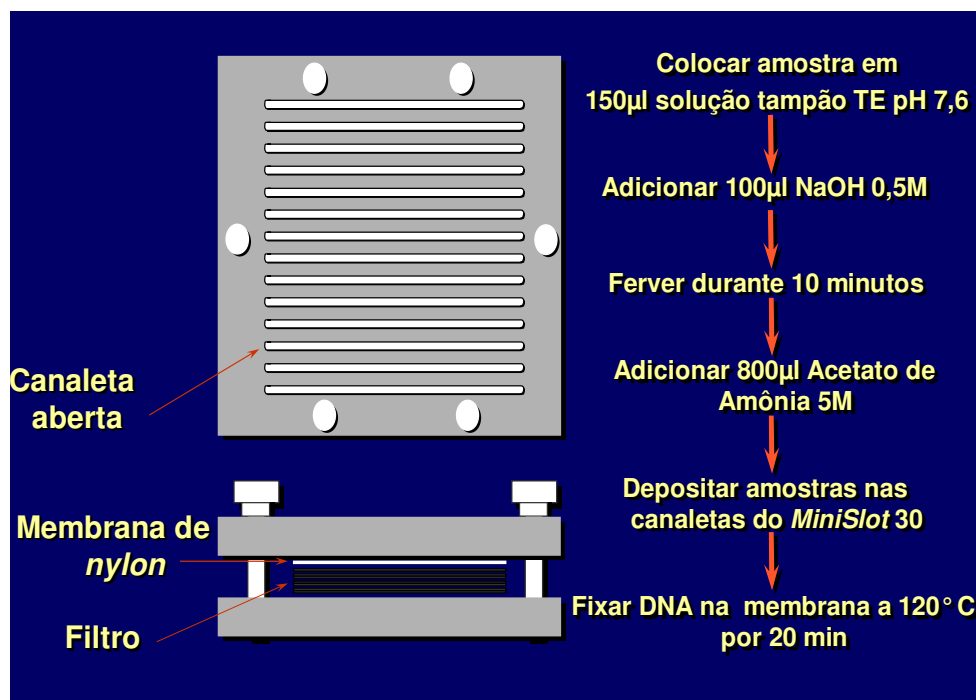
#### 4.7.6 Detecção das espécies

Após o período de hibridização, a membrana foi removida do *Miniblotter* 45 (Immunetics), lavada por 40 minutos a 65°C numa solução adstringente composta por 1% de SDS, 1mM de EDTA e 20mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , a fim de

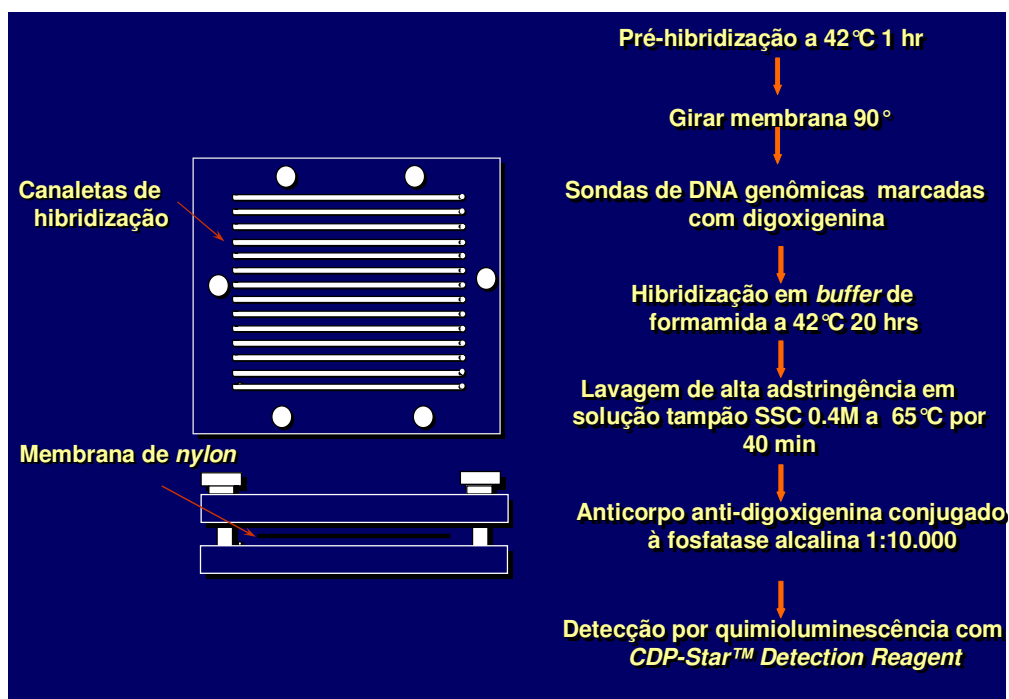
remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, a membrana foi imersa por 1 hora em uma solução contendo 1% de ácido maleico ( $C_4H_4O_4$ , Vetec), 3M NaCl, 0,2M NaOH (Labsynth), 0,3% Tween 20 (Vetec), 0,5% caseína, pH 8,0, e, logo após, por 30 minutos, na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) em uma concentração de 1:10.000. A membrana foi, então, lavada 2 vezes, por 20 minutos, em uma solução de 0,1M de ácido maleico, 3M de NaCl, 0,2M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0, e 1 vez, por 5 minutos, em uma solução de 0,1M de Tris HCl, 0,1M de NaCl, pH 9,5.

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

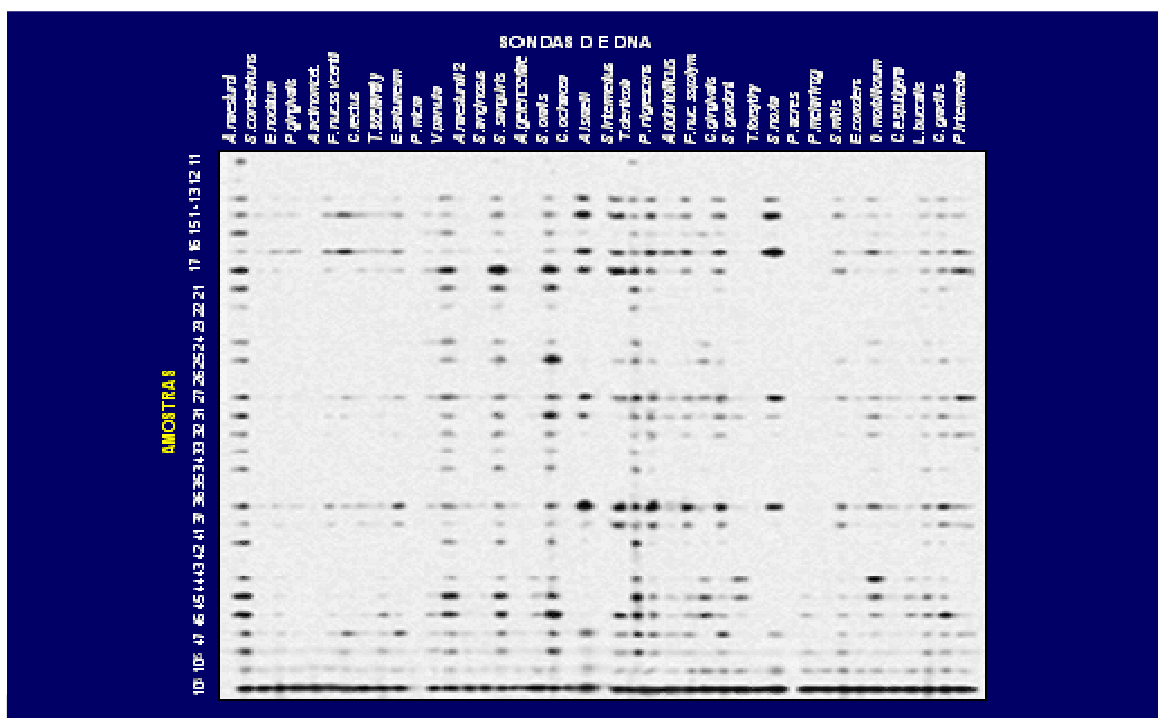
A leitura dos filmes radiográficos foi realizada por um único examinador treinado, calibrado e cego para as terapias empregadas. A leitura foi realizada 2 vezes, em dias diferentes, para conferência de resultados. Cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de biofilme foi comparado, em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



**Figura 2.** Representação gráfica do Minislot 30 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo da preparação e colocação das amostras de biofilme subgengival na membrana de nylon (técnica checkerboard DNA-DNA hybridization).



**Figura 3.** Representação gráfica do *Miniblotter* 45 (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e resumo das etapas de hibridização e detecção das espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgengival (técnica checkerboard DNA-DNA hybridization).



checkerboard DNA-DNA hybridization).

**Tabela 2.** Índice utilizado para a determinação dos níveis dos microrganismos nas amostras de biofilme subgingival.

| 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 |

#### 4.8 Análise estatística

Os dados disponíveis para avaliação microbiológica foram provenientes da análise das 40 espécies bacterianas em 9 amostras de biofilme subgingival por indivíduo, em 118 indivíduos (RAR n=19, CHX n=20, MTZ n=20, MTZ+CHX n=20, MTZ+AMX n=19 e MTZ+AMX+CLX n=19).

Esses dados foram expressos de 2 maneiras: contagens (níveis) e % de contagem das sondas de DNA (proporção). Os níveis ( $\times 10^5$ ) foram computados por indivíduo e depois dentro de cada grupo terapêutico, em cada tempo do estudo. A partir desses dados foram calculadas as proporções de cada espécie por sítio, por indivíduo e finalmente no grupo. Diferenças nos níveis médios e proporções de cada espécie bacteriana individualmente ou nas proporções dos diferentes complexos bacterianos entre os grupos terapêuticos em diferentes tempos experimentais foram avaliadas por meio do teste Kruskal-Wallis. Caso diferença estatística fosse detectada, o teste Mann-Whitney foi empregado para identificar as diferenças entre cada dois grupos. Diferenças nos níveis médios ou nas proporções de microrganismos ou grupos bacterianos dentro de cada grupo, entre o início do estudo e os diferentes tempos experimentais, foram avaliadas por meio do teste Kruskal-Wallis. Caso diferença estatística fosse detectada, o teste Wilcoxon foi empregado para identificar as diferenças entre cada dois tempos experimentais. A significância estatística foi estabelecida em 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando ajustes para comparações múltiplas. Foi aplicada a fórmula  $0,05 = 1 - (1-K)^{40}$ , onde k é o valor equivalente ao  $p < 0,05$  quando ajustado para a comparação de 40 bactérias. Desta forma, as diferenças detectadas no presente estudo foram consideradas significativas quando  $p < 0,00125$  ( $p < 0,05$ ), como proposto por Socransky et al. (1991).

A média das medidas clínicas de profundidade de sondagem e nível clínico de inserção, assim como a média da porcentagem de sítios apresentando placa visível, sangramento gengival, sangramento à sondagem e supuração foram computadas para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para examinar diferenças entre os 6 grupos terapêuticos em cada tempo experimental. Caso diferença estatística fosse detectada, o teste de Mann-Whitney foi empregado para identificar as diferenças entre cada dois grupos. A significância estatística foi estabelecida em 5% ( $p < 0,05$ ). As diferenças dentro de cada grupo, entre os tempos experimentais foram avaliadas utilizando o teste Wilcoxon.

## 5. RESULTADOS

O estudo foi realizado no período de março de 2007 à março de 2009. Cento e vinte indivíduos foram incluídos, porém, 3 desses indivíduos (1 do grupo RAR, 1 do grupo MTZ+AMX e 1 do grupo MTZ+AMX+CLX) foram excluídos da análise dos resultados por terem comparecido apenas na consulta inicial. Os motivos da desistência desses 3 indivíduos não foram identificados, uma vez que não conseguimos mais contato por telefone ou telegrama. Outros 5 indivíduos não compareceram a uma das duas consultas de reavaliação (1 do grupo CLX, 3 do grupo MTZ+CLX e 1 do grupo MTZ+AMX+CLX), por motivos particulares como viagem ou trabalho. Nesses casos os dados da consulta que eles compareceram foram repetidos na consulta faltante (*intention to treat analysis*). Logo, o total de indivíduos em cada grupo terapêutico foi como a seguir: RAR (n=19), CHX (n=20), MTZ (n=20), MTZ+CHX (n=20), MTZ+AMX (n=19) e MTZ+AMX+CLX (n=19).

As características epidemiológicas e as médias dos parâmetros clínicos avaliados no exame inicial e 6 meses pós-RAR, nos seis grupos terapêuticos, estão apresentadas na Tabela 3. No início do estudo não houve diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos parâmetros avaliados. ( $p > 0,05$ ). Aos 6 meses após as terapias o grupo que associou todas as terapias (MTZ+AMX+CLX) apresentou as menores médias de NCI ( $3,0 \text{ mm} \pm 1,0 \text{ mm}$ ) e ISG ( $5,4\% \pm 8,6\%$ ) em comparação aos outros grupos do estudo ( $p < 0,05$ ). Em relação à PS, as médias observadas nos grupos MTZ+CLX ( $2,5 \text{ mm} \pm 0,4 \text{ mm}$ ), MTZ+AMX ( $2,6 \text{ mm} \pm 0,3 \text{ mm}$ ) e MTZ+AMX+CLX ( $2,7 \text{ mm} + 0,6 \text{ mm}$ ) foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ); porém, inferiores às médias dos grupos RAR ( $3,0 \text{ mm} \pm 0,6 \text{ mm}$ ), CLX ( $2,9 \text{ mm} \pm 0,6 \text{ mm}$ ) e MTZ ( $2,8 \text{ mm} \pm 0,4 \text{ mm}$ ). Já para os parâmetros IPV, SS e SUP ( $p > 0,05$ ) não houve diferenças significativas entre os grupos. A Figura 5 mostra a freqüência de sítios com PS  $\geq 5 \text{ mm}$  no início do estudo e após 6 meses. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos no início do estudo ( $p > 0,05$ ). Todas as terapias reduziram a freqüência de sítios com PS  $\geq 5 \text{ mm}$  aos 6 meses de observação. Porém, os grupos MTZ+CLX, MTZ+AMX e MTZ+AMX+CLX apresentaram um percentual de sítios  $\geq 5 \text{ mm}$

significativamente menor do que os demais grupos aos 6 meses pós-RAR. O maior percentual de bolsas profundas pós-RAR foi observado no grupo RAR.

Os resultados obtidos nas avaliações microbiológicas estão representados nas figuras 6 a 12. Os níveis (média de contagem  $\times 10^5$ ) das 40 espécies bacterianas avaliadas no início do estudo, aos 3 e 6 meses pós-RAR estão apresentados na Figura 6. De forma geral, em todos os grupos ocorreu redução das três espécies do complexo vermelho (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*). Os níveis da maioria das espécies do complexo laranja foram reduzidos em todos os grupos aos 6 meses pós-RAR, mas nenhuma dessas reduções foi estatisticamente significativa no grupo RAR. No grupo MTZ houve a redução significativa de uma espécie; e nos demais grupos de 3 a 6 espécies do complexo laranja estavam reduzidas aos 6 meses de avaliação. Os níveis das espécies dos complexos compatíveis com saúde (complexos azul, roxo, amarelo e verde) foram pouco alterados por todas as terapias. De forma geral não houve diferenças significativas entre os tempos inicial e 6 meses pós-RAR, mas os indivíduos do grupo MTZ+AMX+CLX mostraram uma tendência maior em elevar os níveis de algumas espécies benéficas dos complexos azul e roxo, em relação às demais terapias.

A Figura 7 apresenta os resultados da média das proporções das 40 espécies avaliadas nos três tempos experimentais. Aos 6 meses, os três patógenos do complexo vermelho estavam reduzidos, em relação ao início do estudo, em todos os grupos terapêuticos. As proporções do patógeno periodontal *E. nodatum*, também sofreram reduções significativas em todos os grupos. No total, apenas essa espécie do complexo laranja estava reduzida nos grupos MTZ e MTZ+CLX, duas espécies nos grupos controle, CLX e MTZ+AMX; e três espécies no grupo MTZ+AMX+CLX. A proporção de diversas espécies benéficas sofreu aumento após as terapias, sendo que essas diferenças foram significativas para *A. naeslundii* 2 nos grupos CLX, MTZ+CLX, MTZ+AMX e MTZ+AMX+CLX. Neste último grupo também houve aumento na proporção de *A. gerencseriae*.

A Figura 8 mostra as alterações ocorridas nas proporções dos diferentes complexos microbianos (SOCRANSKY et al. 1998) em todos os grupos e tempos experimentais. Não houve diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos complexos avaliados no início do estudo, entre os seis

grupos experimentais. Aos 6 meses de avaliação todas as terapias levaram a uma redução significativa nas proporções do complexo vermelho. Já a proporção do complexo laranja sofreu redução estatisticamente significativa nos grupos CLX (28,8% para 20,2%), MTZ+AMX (31,4% para 23,4%) e MTZ+AMX+CLX (28,1% para 21,1%). Porém, quando os seis grupos foram comparados, a menor proporção de complexo vermelho pós-RAR foi sempre observada no grupo MTZ+AMX+CHX (1,3% e 1,8%, aos 3 e 6 meses respectivamente). As proporções dos complexos considerados benéficos (verde, roxo, amarelo e azul) aumentaram de forma geral após as terapias. Na reavaliação de 6 meses, o complexo azul mostrou aumento significativo em todos os grupos, exceto no grupo MTZ. O complexo roxo também estava em proporções significativamente maiores neste tempo experimental nos grupos RAR, MTZ, MTZ+AMX e MTZ+AMX+CLX.

Para um melhor entendimento do efeito das diferentes terapias e para permitir comparações mais detalhadas entre os grupos os sítios foram divididos em categorias baseadas nos valores iniciais de PS, em rasos ( $PS < 5$  mm), e profundos ( $PS \geq 5$  mm). As médias das proporções de cada uma das 40 espécies avaliadas entre o tempo inicial e 6 meses nas duas categorias estão apresentadas nas Figuras 9 e 10. Em relação aos sítios inicialmente profundos (Figura 9), após ajuste para comparações múltiplas, apenas os grupos MTZ+CLX, MTZ+AMX e MTZ+AMX+CLX sofreram reduções estatisticamente significativas das três espécies do complexo vermelho ( $p < 0,01$ ). *T. forsythia* e *P. gingivalis* também foram significativamente reduzidos ( $p < 0,01$ ) nos grupos CLX e MTZ, e *T. denticola* mostrou redução significativa, na análise não ajustada ( $p < 0,05$ ) nesses dois grupos. No grupo RAR apenas *T. forsythia* foi significativamente reduzida, porém na análise não ajustada ( $p < 0,05$ ). Em relação aos patógenos do complexo laranja a proporção de *E. nodatum* sofreu redução em todos os grupos terapêuticos, e essa foi a única espécie significativamente reduzida nos grupos RAR e RAR+MTZ, enquanto que as demais terapias levaram a redução de 3 ou 4 espécies, dependendo se as análises foram ou não ajustadas para comparações múltiplas. Em relação aos complexos que abrigam as espécies compatíveis com saúde, as principais alterações em 6 meses nas bolsas profundas ocorreram nas espécies do complexo azul. Todas as terapias levaram ao aumento significativo nas



proporções de *A. naeslundii 2* ( $p < 0.00125$  ou  $p < 0.05$ ). Mais uma espécie de *Actinomyces* sofreu aumento em proporção no grupo MTZ+AMX, duas no grupo CHX e 3 no grupo MTZ+AMX+CLX ( $p < 0,05$ ).

Quando as bolsas inicialmente rasas foram avaliadas (Figura 10) observou-se que nas análises ajustadas para comparações múltiplas ( $p < 0.00125$ ), em relação ao complexo vermelho as terapias de RAR ou RAR+CLX não foram capazes de reduzir significativamente as proporções desses três patógenos. De 1 a 4 espécies do complexo laranja foram reduzidas nos diversos grupos terapêuticos aos 6 meses após o término da RAR. *A. actinomycetemcomitans* também mostrou redução significativa nos grupos MTZ e MTZ+AMX. Em relação aos complexos benéficos, no grupo MTZ+CLX houve aumento nas proporções de 4 espécies (*A. naeslundii 2*, *S. intermedius* e *S. mitis*, *S. sanguinis*), 2 espécies no grupo MTZ+AMX (*A. naeslundii 2* e *S. gordonii*), e de 3 espécies no grupo MTZ+AMX+CLX (*A. gerencseriae*, *A. naeslundii 2* e *S. mitis*).

As Figuras 11 e 12 mostram as alterações ocorridas nas proporções dos complexos microbianos nos sítios com PS inicial  $\geq 5$  mm e  $< 5$  mm, respectivamente. As proporções dos complexos foram semelhantes no início do estudo, sem diferenças estatísticas entre os seis grupos experimentais, para as duas categorias de bolsas. Porém, os perfis microbianos foram afetados após os tratamentos com diferentes graus de efetividade, dependendo da terapia empregada. Todos os grupos sofreram reduções significativas nas proporções do complexo vermelho, tanto nas bolsas inicialmente profundas (PS  $\geq 5$  mm), quanto nas rasas (PS  $< 5$  mm). Porém, vale destacar que os indivíduos que receberam todas as terapias combinadas (grupo MTZ+AMX+CLX) apresentaram as menores proporções desses patógenos aos 3 e 6 meses de observação, em comparação com os indivíduos dos demais cinco grupos. Nas bolsas inicialmente profundas essas diferenças foram estatisticamente significativas aos 3 meses, onde a proporção de complexo vermelho estava abaixo de 1% (0,8%) no grupo MTZ+AMX+CLX. Já aos 6 meses pós-RAR esse complexo estava em menores proporções ( $p < 0,05$ ) nos dois grupos que receberam AMX e MTZ, em comparação com os demais. Ainda na categoria de bolsas  $\geq 5$  mm, todas as terapias levaram a uma redução significativa no complexo laranja, com exceção da RAR associada ao

MTZ. Em relação aos complexos benéficos, houve aumento significativo no complexo azul após os tratamentos; e, além disso, todas as terapias que associaram antibióticos levaram ao aumento nas proporções de mais um ou dois complexos benéficos (roxo, verde ou amarelo). Em relação às bolsas rasas (figura 12), todas as terapias estudadas levaram à redução significativa do complexo vermelho, sendo que a menor proporção foi observada no grupo MTZ+AMX+CLX aos 3 (1,2%) e 6 meses (0,9%). Porém, todos os grupos que associaram antibióticos abrigavam proporções significativamente menores desse complexo do que os grupos controle e CLX aos 6 meses de avaliação. Já o complexo azul estava significativamente aumentado neste tempo experimental, em relação ao início do estudo, apenas nos grupos MTZ+AMX e MTZ+AMX+CLX.

Os efeitos adversos provocados pelo uso dos antibióticos sistêmicos, bem como pela utilização do antisséptico, também foram avaliados neste estudo (Tabelas 4 e 5). A Tabela 4 apresenta os efeitos adversos que ocorreram no período de ingestão dos antibióticos sistêmicos e placebos. Todos os indivíduos, independente do grupo de tratamento, relataram ter conseguido tomar os medicamentos como lhes foi orientado. O percentual de indivíduos que afirmaram ter sofrido algum mal estar foi de aproximadamente 6%; porém, houve relato de mal-estar também no grupo que recebeu apenas RAR também. Os indivíduos que se queixaram de “gosto metálico na boca” representaram 12,5% no grupo RAR, 12,5% no MTZ, 21,5% no MTZ+CLX e 10,5% no MTZ+AMX+CLX. Mau humor e falta de ânimo afetaram 6,3% dos pacientes dos grupos MTZ e MTZ+AMX. Apenas 6,3% dos pacientes do grupo MTZ+AMX relataram que o horário de ingestão das drogas atrapalhou o seu dia-a-dia. Todos os pacientes afirmaram fazer uso dos antibióticos novamente se necessário exceto um paciente do grupo RAR.

Em relação ao uso de bochechos com clorexidina, os principais relatos de efeitos adversos foram provenientes dos indivíduos dos grupos CLX, MTZ+CLX e MTZ+AMX+CLX, que utilizaram bochechos com o princípio ativo do medicamento. Vale ressaltar que todos os indivíduos disseram que usariam o bochecho novamente caso fosse necessário (Tabela 5). As principais queixas foram gosto metálico na boca, alteração do paladar e pigmentação de língua e dentes.

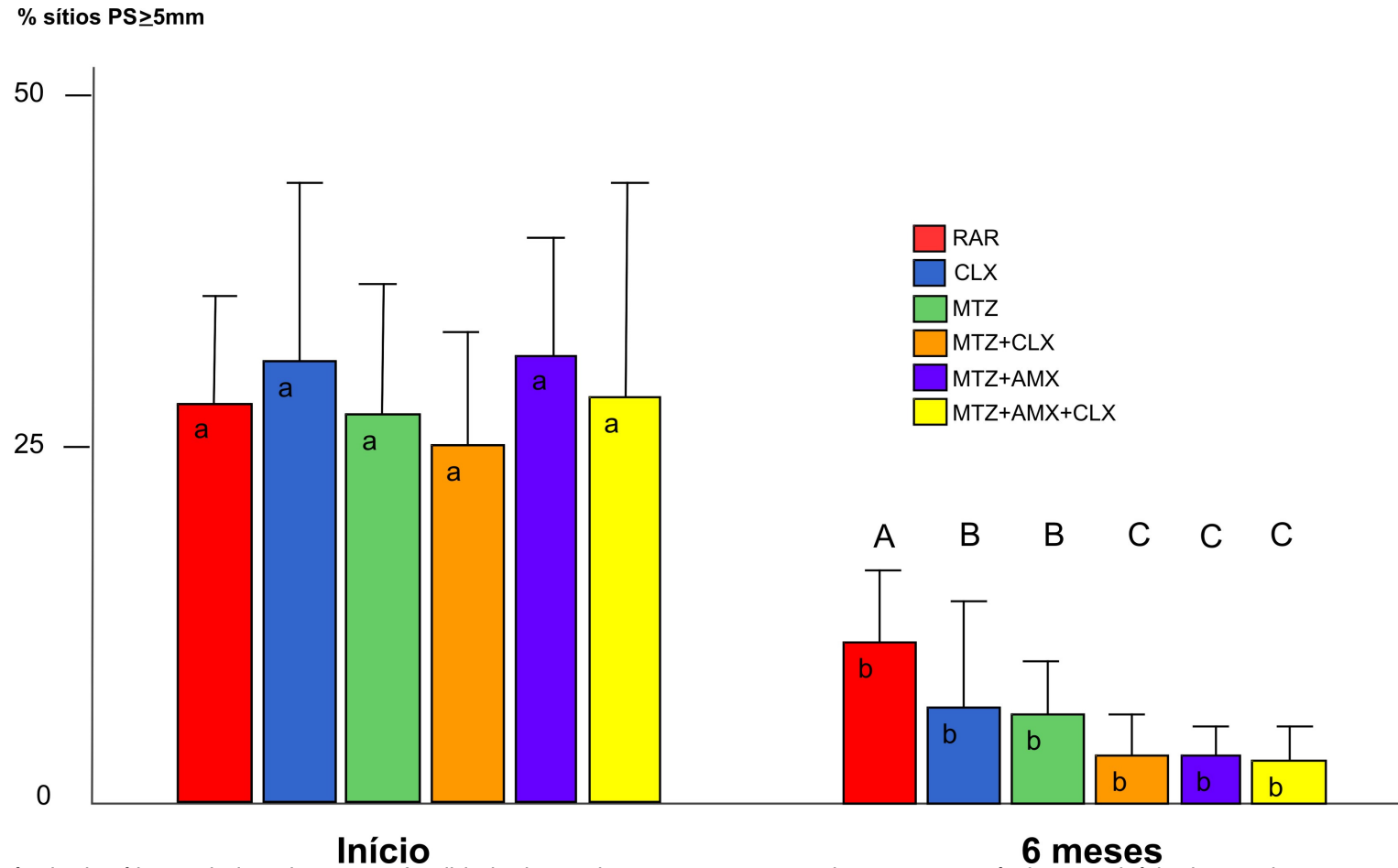
**Tabela 3.** Média ( $\pm$ DP) dos parâmetros clínicos, no exame inicial e 6 meses pós-terapia, para os seis grupos terapêuticos.

| Variáveis        | Grupos terapêuticos          |                              |                               |                              |                              |                            |
|------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
|                  | RAR<br>n=19                  | CLX<br>n=20                  | MTZ<br>n=20                   | MTZ+CLX<br>n=20              | MTZ+AMX<br>n=19              | MTZ+AMX+CLX<br>n=19        |
| Gênero (Ma / Fe) | 4 / 15                       | 8 / 12                       | 10 / 10                       | 5 / 15                       | 6 / 13                       | 10 / 9                     |
| Idade (anos)     | 45,2 $\pm$ 10,1              | 41,6 $\pm$ 7,2               | 44,7 $\pm$ 8,5                | 48,8 $\pm$ 7,7               | 43,9 $\pm$ 7,9               | 45,0 $\pm$ 6,8             |
| Exame inicial    |                              |                              |                               |                              |                              |                            |
| PS (mm)          | 3,7 $\pm$ 0,5                | 3,9 $\pm$ 0,8                | 3,7 $\pm$ 0,6                 | 3,6 $\pm$ 0,4                | 3,8 $\pm$ 0,5                | 3,9 $\pm$ 1,3              |
| NCI (mm)         | 4,4 $\pm$ 0,8                | 4,3 $\pm$ 1,1                | 4,1 $\pm$ 0,8                 | 4,1 $\pm$ 0,6                | 4,4 $\pm$ 0,6                | 4,2 $\pm$ 1,1              |
| % sítios         |                              |                              |                               |                              |                              |                            |
| IPV 1            | 80,0 $\pm$ 16,0              | 76,6 $\pm$ 17,0              | 72,5 $\pm$ 17,2               | 79,9 $\pm$ 17,9              | 78,7 $\pm$ 15,0              | 77,3 $\pm$ 15,4            |
| ISG 1            | 37,1 $\pm$ 26,4              | 36,2 $\pm$ 27,2              | 36,5 $\pm$ 25,5               | 36,0 $\pm$ 22,2              | 40,0 $\pm$ 28,1              | 22,7 $\pm$ 25,5            |
| SS 1             | 72,1 $\pm$ 0,5               | 69,6 $\pm$ 26,1              | 73,1 $\pm$ 20,7               | 74,8 $\pm$ 14,2              | 72,5 $\pm$ 16,0              | 74,5 $\pm$ 23,1            |
| Sup1             | 0,91 $\pm$ 0,8               | 1,2 $\pm$ 2,2                | 3,3 $\pm$ 8,8                 | 0,2 $\pm$ 0,6                | 5,4 $\pm$ 8,3                | 3,5 $\pm$ 9,8              |
| Exame 6 meses    |                              |                              |                               |                              |                              |                            |
| PS (mm) *        | 3,0 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>   | 2,9 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>   | 2,8 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>    | 2,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>   | 2,6 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>   | 2,7 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup> |
| NCI (mm)*        | 3,8 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>   | 3,4 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>   | 3,3 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>    | 3,1 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>   | 3,3 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>   | 3,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup> |
| % sítios         |                              |                              |                               |                              |                              |                            |
| IPV 1            | 35,3 $\pm$ 22,9              | 25,9 $\pm$ 14,0              | 28,5 $\pm$ 17,8               | 31,1 $\pm$ 22,2              | 34,4 $\pm$ 22,6              | 27,8 $\pm$ 17,0            |
| ISG 1*           | 13,7 $\pm$ 14,3 <sup>b</sup> | 11,1 $\pm$ 11,2 <sup>b</sup> | 11,0 $\pm$ 10,89 <sup>b</sup> | 15,2 $\pm$ 18,7 <sup>b</sup> | 13,4 $\pm$ 14,8 <sup>b</sup> | 5,4 $\pm$ 8,6 <sup>a</sup> |
| SS 1             | 18,7 $\pm$ 20,1              | 18,5 $\pm$ 20,9              | 13,5 $\pm$ 15,8               | 18,8 $\pm$ 27,5              | 15,8 $\pm$ 23,4              | 8,8 $\pm$ 12,7             |
| Sup 1            | 0,2 $\pm$ 0,5                | 0,8 $\pm$ 3,3                | 0 $\pm$ 0                     | 0,2 $\pm$ 0,9                | 0 $\pm$ 0                    | 0,1 $\pm$ 0,3              |

RAR: Raspagem e alisamento radicular; CLX: Clorexidina; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina; PS: Profundidade de Sondagem; NCI: Nível Clínico de Inserção; IPV 1: Índice de Placa Visível (escore 1); ISG 1: Índice de Sangramento Gingival (escore 1); SS 1: Sangramento à Sondagem (escore 1); Sup 1: Supuração (escore 1).

\* Teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

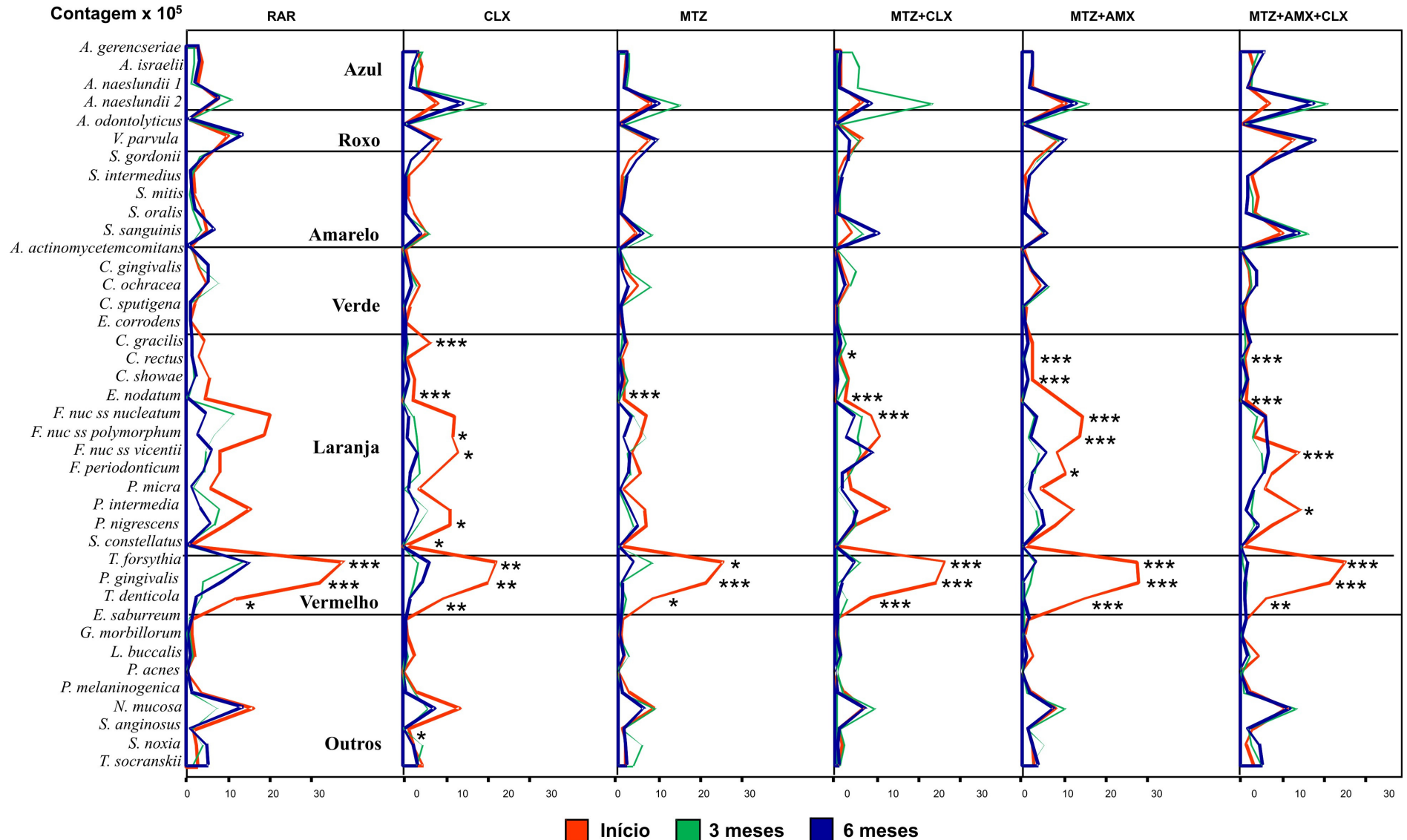
Teste Mann-Whitney: Letras distintas entre os tratamentos indicam as diferenças estatísticas existentes.



**Figura 5.** Frequência de sítios periodontais com profundidade de sondagem  $\geq$  5mm, nos seis grupos terapêuticos, no início do estudo e 6 meses pós-RAR. RAR: Raspagem e alisamento radicular; CLX: Clorexidina; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina.

Teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) - Teste U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos em cada tempo experimental

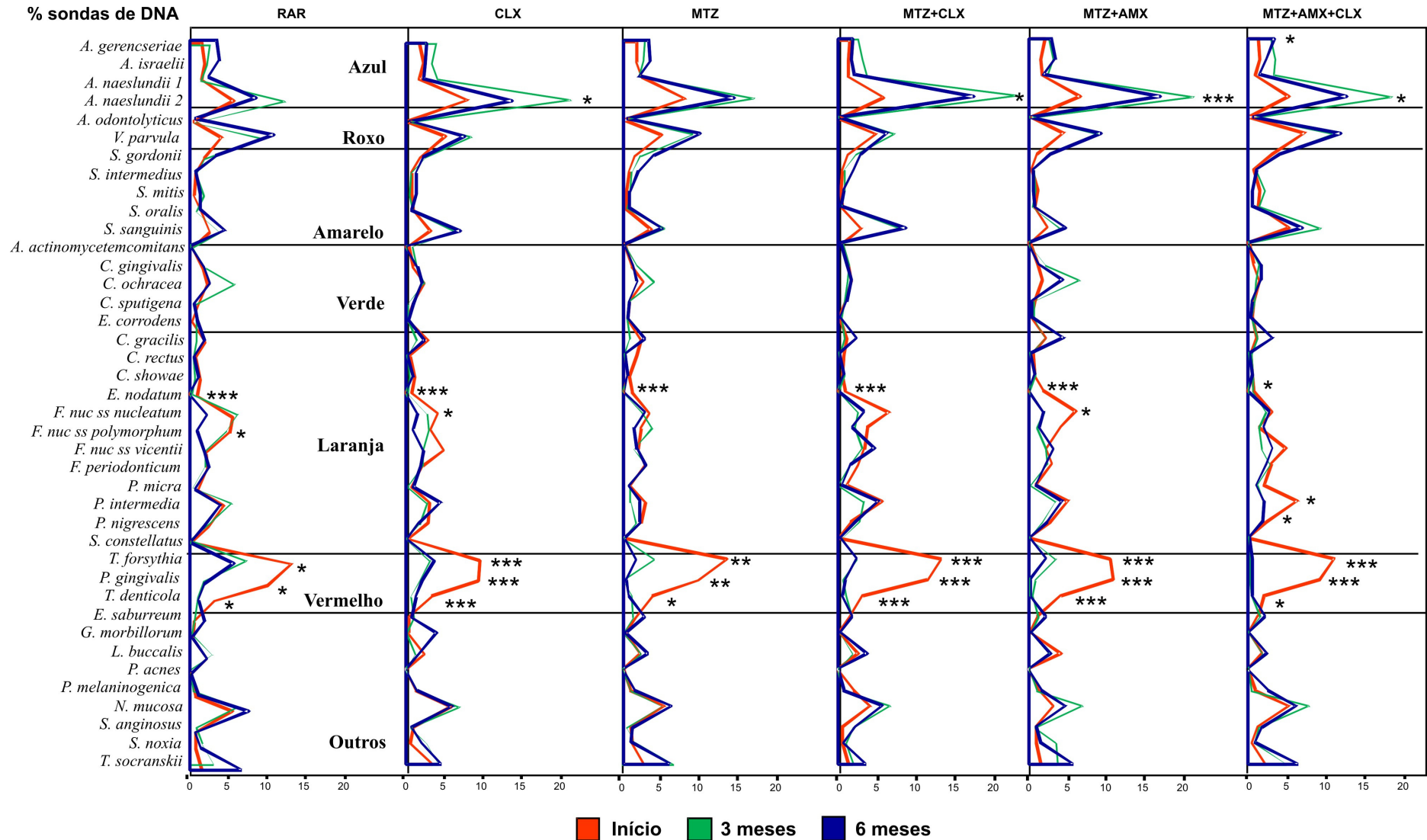
Teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ): Letras minúsculas indicam diferenças significativas dentro de cada grupo entre o início do estudo e 6 meses.



**Figura 6.** Perfil microbiano na contagem total das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-RAR.

RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina; CLX: Clorexidina

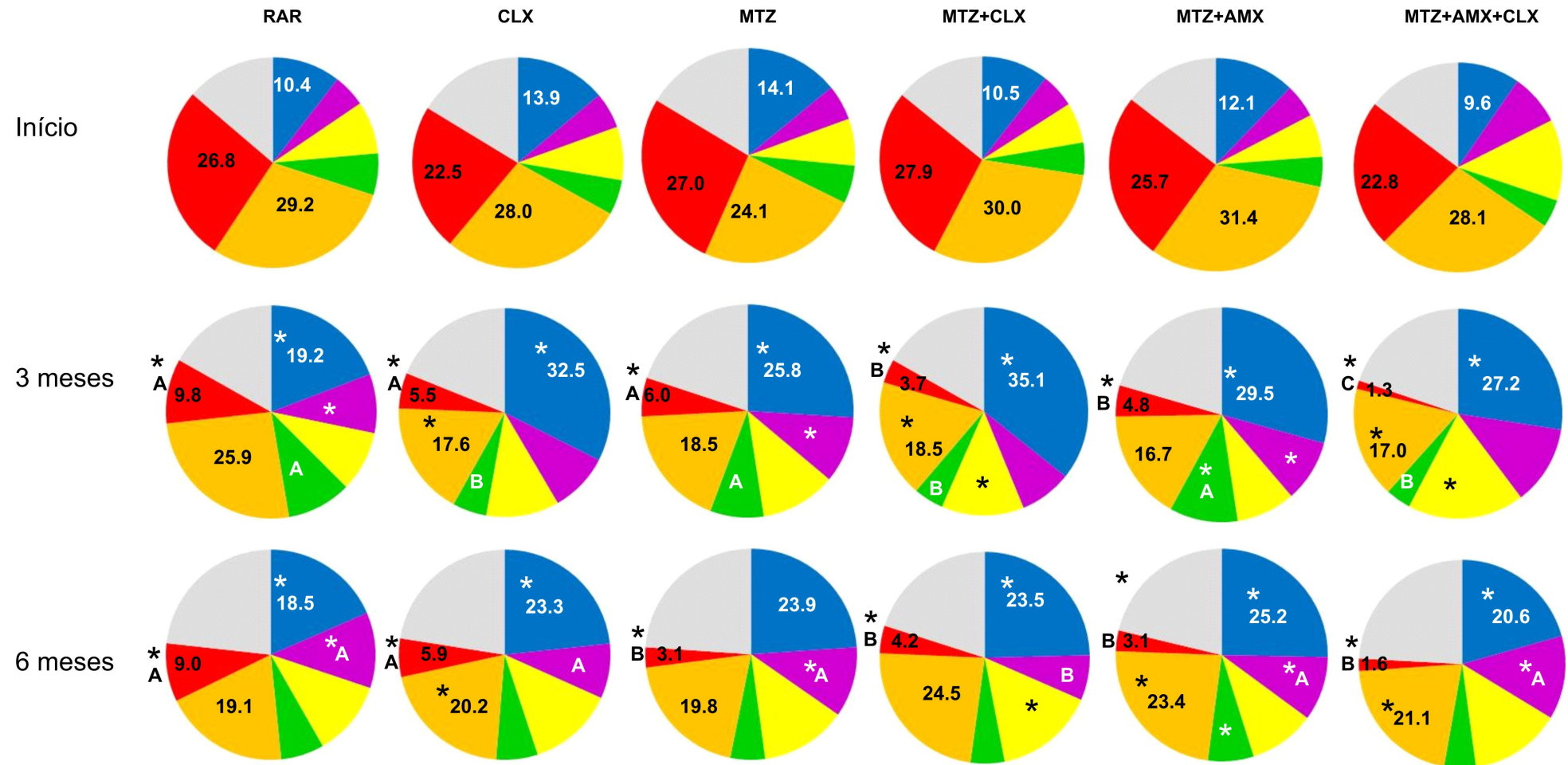
Teste Wilcoxon (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). \* indicam diferenças significativas entre os tempos. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas (Socransky et al., 1991).



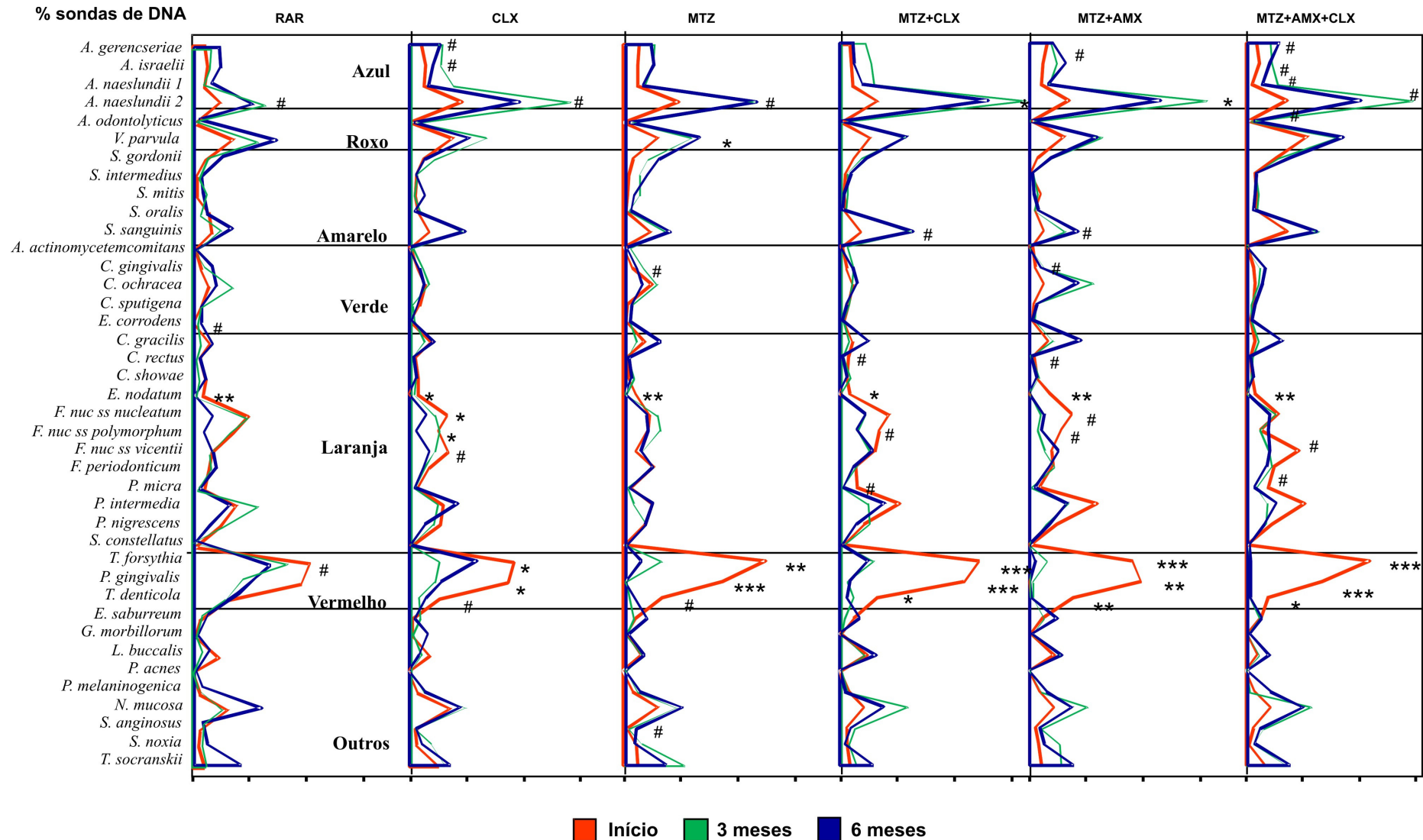
**Figura 7.** Perfil microbiano das médias de proporção (%) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo 3 e 6 meses pós-RAR.

RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina; CLX: Clorexidina

Teste de Wilcoxon (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). \* indicam diferenças significativas entre os tempos. Os resultados foram ajustados para comparações múltiplas (Socransky et al., 1991).



**Figura 8.** Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-RAR. RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina; CLX: Clorexidina. Teste Kruskal-Wallis (\* $p < 0,05$ ) - Teste U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ): letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos em cada tempo. Teste Kruskal-Wallis (\* $p < 0,05$ ) - Teste Wilcoxon ( $p < 0,05$ ): \* indicam diferenças significativas dentro de cada grupo entre os tempos;

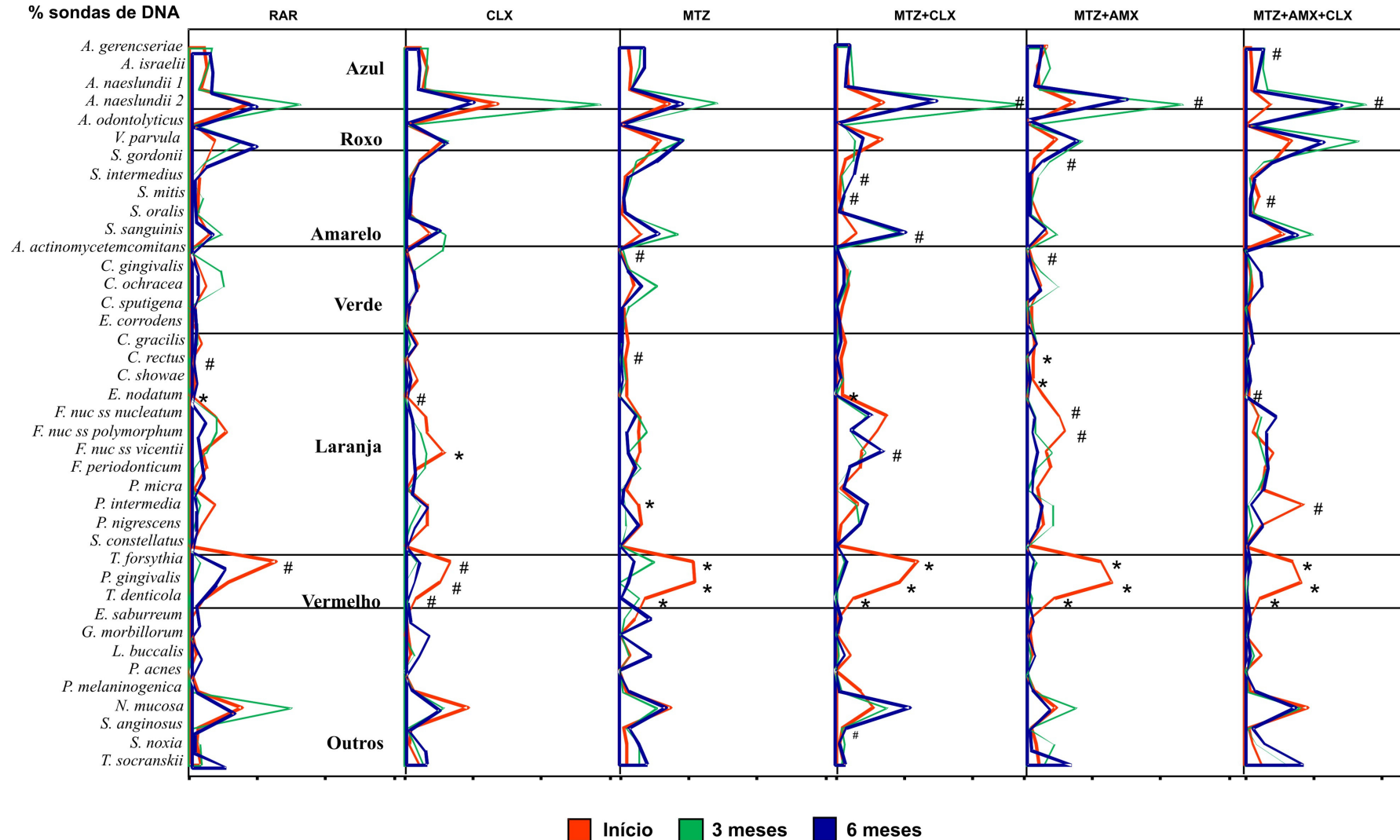


**Figura 9.** Perfil microbiano das médias de proporção (%) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo 3 e 6 meses pós-RAR, nos sítios com PS  $\geq$  5mm.

RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina; CLX: Clorexidina. Teste de Wilcoxon (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

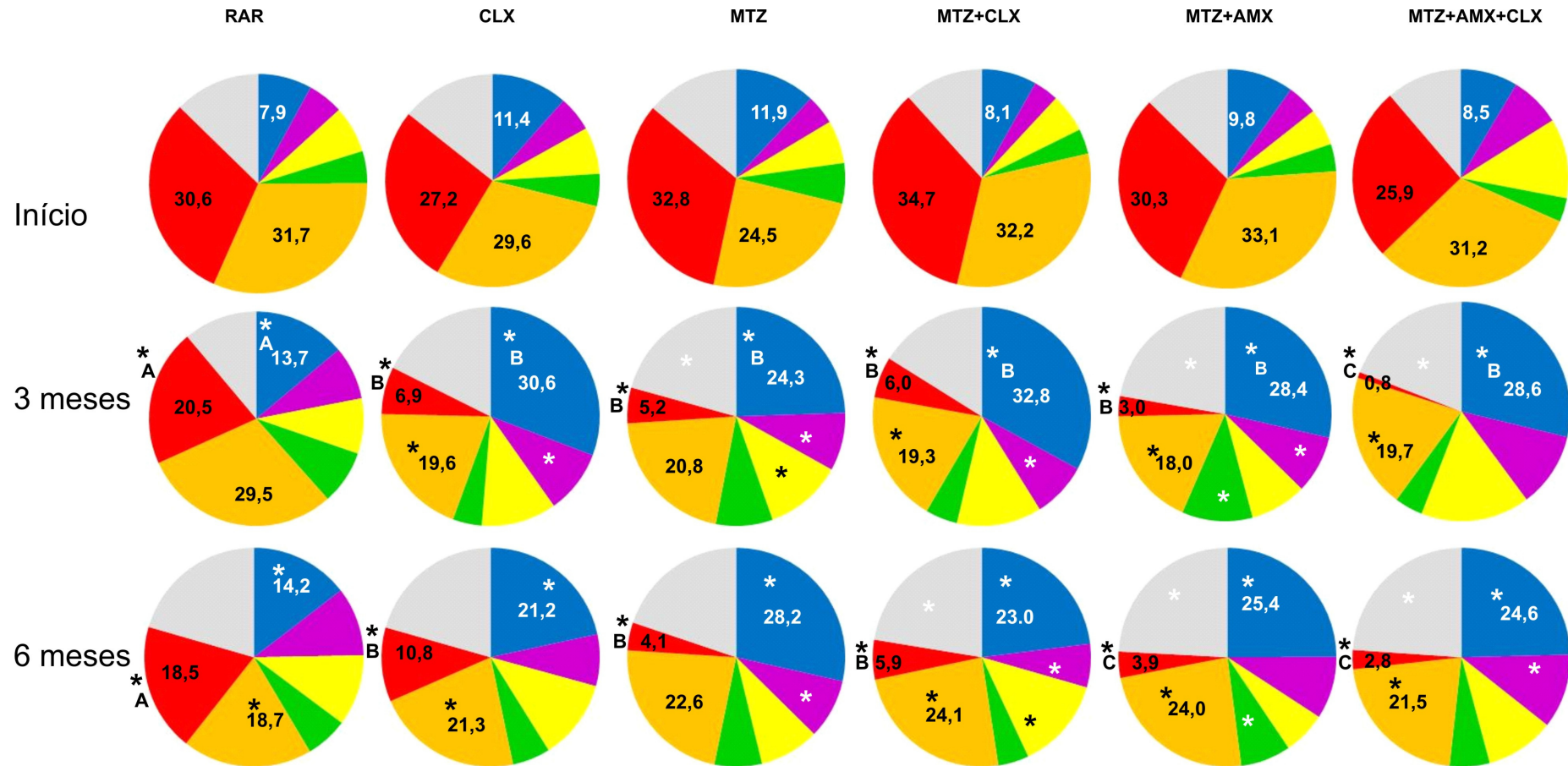
\* indicam diferenças significantivas entre os tempos com ajuste para comparações múltiplas. # indicam diferenças significantivas entre os tempos sem ajuste para comparações múltiplas (#  $p < 0,00125 = p < 0,05$ ) (Socransky et al., 1991).



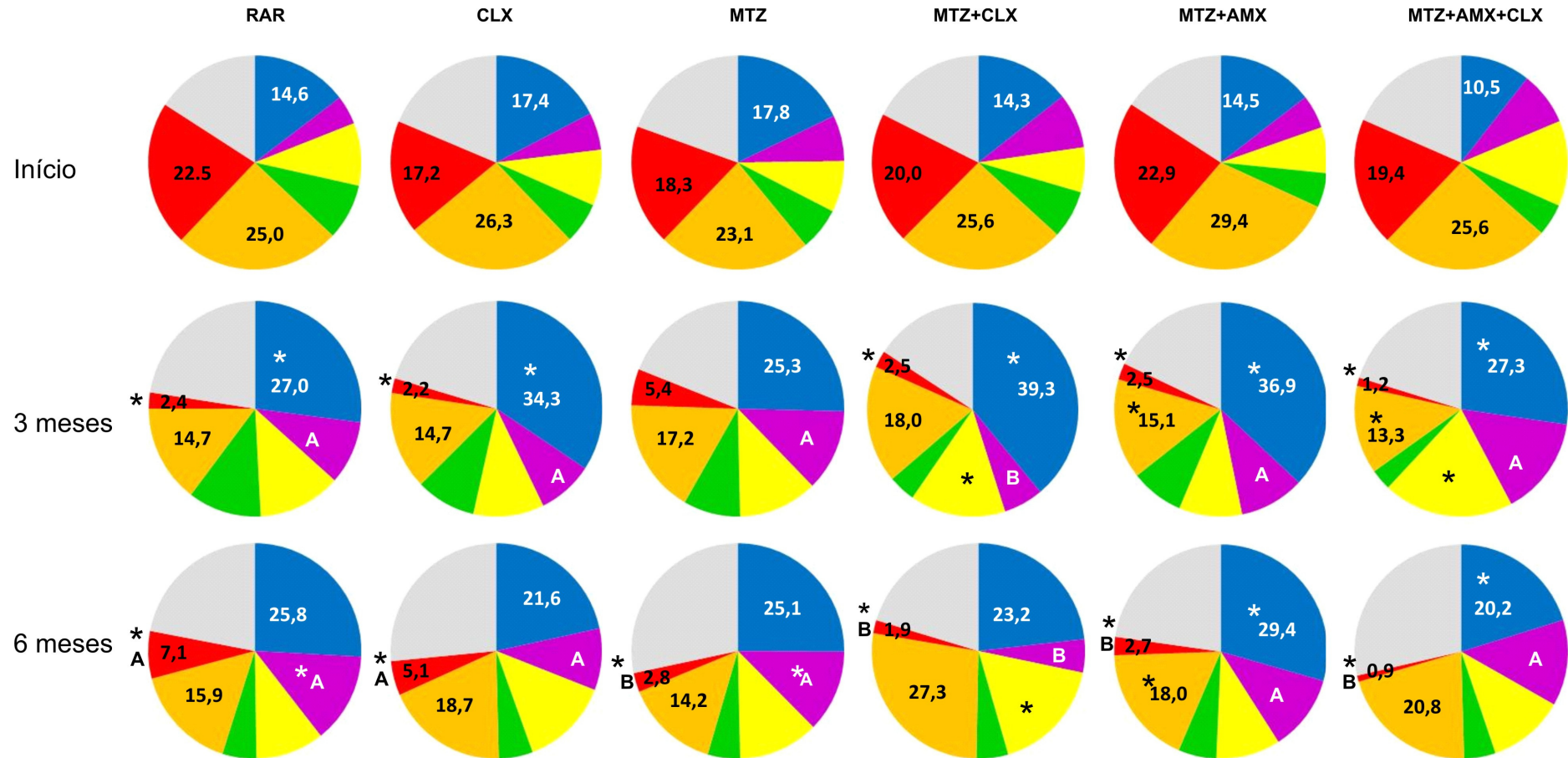


**Figura 10.** Perfil microbiano das médias de proporção (%) das 40 espécies bacterianas presentes nas amostras de biofilme subgingival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-RAR, nos sítios com PS < 5mm.

RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina; CLX: Clorexidina. Teste de Wilcoxon. \* indicam diferenças significativas entre os tempos com ajuste para comparações múltiplas (\* $p < 0,05$ ). # indicam diferenças significativas entre os tempos sem ajuste para comparações múltiplas (# $p < 0,00125 = p < 0,05$ ) (Socransky et al., 1991).



**Figura 11.** Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-terapia, nos sítios com PS inicial  $\geq 5$  mm. RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina; CLX: Clorexidina. Teste Kruskal-Wallis ( $*p < 0,05$ ) - Teste U de Mann-Whitney ( $*p < 0,05$ ): letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos em cada tempo. Teste Kruskal-Wallis ( $*p < 0,05$ ) - Teste de Wilcoxon ( $*p < 0,05$ ): \* indicam diferenças significativas dentro de cada grupo entre os tempos.



**Figura 12.** Proporções (%) dos complexos microbianos presentes nas amostras de biofilme subgengival no início do estudo, 3 e 6 meses pós-terapia, nos sítios com PS inicial < 5 mm. RAR: Raspagem e alisamento radicular; MTZ: Metronidazol; AMX: Amoxicilina; CLX: Clorexidina. Teste Kruskal-Wallis (\* $p < 0,05$ ) - Teste U de Mann-Whitney (\* $p < 0,05$ ): letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos em cada tempo. Teste Kruskal-Wallis (\* $p < 0,05$ ) - Teste de Wilcoxon (\* $p < 0,05$ ): \* indicam diferenças significativas dentro de cada grupo entre os tempos;

**Tabela 4.** Percentual (%) das respostas afirmativas do questionário de efeitos adversos dos antibióticos, para os seis grupos terapêuticos.

| Questionário   | RAR   | RAR <sup>+</sup><br>CLX | RAR <sup>+</sup><br>M | RAR <sup>+</sup><br>M/CLX | RAR <sup>+</sup><br>M/A | RAR <sup>+</sup><br>M/A/CLX |
|--|-------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------------|
|  | C     | T1                      | T2                    | T3                        | T4                      | T5                          |
| 1. Você conseguiu tomar os medicamentos como lhe foi orientado?                                      | 100,0 | 100,0                   | 100,0                 | 100,0                     | 100,0                   | 100,0                       |
| 2. Você sentiu algum mal-estar devido ao medicamento que tomou?                                      | 6,3   | 0,0                     | 6,3                   | 10,5                      | 6,3                     | 5,2                         |
| 3. Sentiu náuseas ou vômito?   | 0,0   | 0,0                     | 0,0                   | 10,5                      | 12,5                    | 0                           |
| 4. Teve diarreia neste período?  | 0,0   | 0,0                     | 6,3                   | 0                         | 6,3                     | 10,5                        |
| 5. Sentiu algum gosto metálico na boca?  | 12,5  | 0,0                     | 12,5                  | 21,5                      | 0,0                     | 10,5                        |
| 6. Sentiu dor de cabeça ou tontura?  | 0,0   | 0,0                     | 6,3                   | 0,0                       | 12,5                    | 15,7                        |
| 7. Caso tenha sentido algum dos problemas das perguntas anteriores, isso atrapalhou o seu dia-a-dia? | 0,0   | 0,0                     | 0,0                   | 0,0                       | 0,0                     | 0,0                         |
| 8. Os medicamentos provocaram mau humor ou irritação?  | 0,0   | 0,0                     | 6,3                   | 0,0                       | 6,3                     | 0,0                         |
| 09. Sentiu fraqueza ou falta de ânimo para o trabalho?   | 0,0   | 0,0                     | 6,3                   | 0,0                       | 6,3                     | 0,0                         |
| 10. Teve sono excessivo devido aos medicamentos?   | 12,5  | 5,9                     | 6,3                   | 0,0                       | 0,0                     | 0,0                         |
| 11. Os horários do medicamento prejudicaram o seu dia-a-dia?   | 0,0   | 0,0                     | 0,0                   | 0,0                       | 6,3                     | 0,0                         |
| 12. Você tomaria os medicamentos novamente caso fosse necessário?                                    | 93,8  | 100                     | 100                   | 100                       | 100                     | 100                         |

**Tabela 5.** Percentual (%) das respostas afirmativas do questionário de efeitos adversos dos enxaguatórios, para os seis grupos terapêuticos.

| Questionário   | RAR  | RAR<br>+<br>CLX | RAR<br>+<br>M | RAR<br>+<br>M/CLX | RAR<br>+<br>M/A | RAR<br>+<br>M/A/CLX |
|--|------|-----------------|---------------|-------------------|-----------------|---------------------|
|  | C    | T1              | T2            | T3                | T4              | T5                  |
| 1) Sentiu gosto metálico na boca?                          | 12,5 | 17,6            | 6,3           | 31,6              | 12,5            | 26,3                |
| 2) Sentiu sensação de ardência?                            | 6,3  | 5,9             | 6,3           | 31,6              | 6,3             | 26,3                |
| 3) Percebeu descamação na mucosa?                          | 0,0  | 11,8            | 12,5          | 10,5              | 0,0             | 15,7                |
| 4) Sentiu alteração de paladar?                            | 12,5 | 35,3            | 12,5          | 23,3              | 12,5            | 31,6                |
| 5) Seus dentes mancharam?                                  | 0,0  | 11,8            | 0,0           | 5,2               | 0,0             | 5,2                 |
| 6) Sua língua manchou?                                     | 0,0  | 11,8            | 0,0           | 10,5              | 0,0             | 15,7                |
| 7) O uso do bochecho provocou mau humor?                   | 0,0  | 5,9             | 6,3           | 0,0               | 0,0             | 0,0                 |
| 8) Os horários de uso prejudicaram seu dia-a-dia?          | 0,0  | 0,0             | 0,0           | 0,0               | 0,0             | 0,0                 |
| 9) Você usaria o bochecho novamente caso fosse necessário? | 100  | 100             | 100           | 100               | 100             | 100                 |

## 6. DISCUSSÃO

A associação de terapias no tratamento da doença periodontal crônica tem mostrado benefícios clínicos e microbiológicos. Dentre os antibióticos sistêmicos utilizados no tratamento periodontal, o MTZ e a combinação de MTZ e AMX têm sido apontados como promissores (FERES et al., 2001; WINKEL et al., 2001; ROONEY et al., 2002; CARVALHO et al., 2004 e 2005; HAFFAJEE et al., 2007; MOEINTEGHAVI et al., 2007; MATARAZZO et al., 2008; CIONCA et al., 2009). Da mesma forma, o controle rigoroso da placa supragengival durante e após a RAR parece oferecer benefícios adicionais, principalmente quando a CLX é utilizada (XIMENEZ-FYVIE et al., 2000b; HAFFAJEE et al., 2003a; CARVALHO et al., 2004 e 2005; FAVERI et al., 2006b e FERES et al., 2009). Porém, até o momento essas terapias não foram comparadas diretamente. Logo, o presente estudo teve por objetivo avaliar e comparar os efeitos na composição da microbiota subgengival da terapia de RAR associada ou não ao MTZ ou ao MTZ e à AMX, com ou sem o controle químico do biofilme supragengival, por meio do bochecho com CLX, no tratamento da periodontite crônica generalizada.

A dosagem e a duração ideais para a administração do MTZ somente ou em combinação com a AMX no tratamento das doenças periodontais ainda não estão determinadas. Diversos estudos avaliaram os efeitos da administração sistêmica desses antibióticos em dosagens que variaram de 200 a 500 mg 3 vezes ao dia (LOESCHE et al., 1984; 1992; 2002; 2005; PALMER et al., 1998 e 1999; FERES et al., 2001; CARVALHO et al., 2004 e 2005; GUERRERO et al., 2005; XAJIGEORGIOU et al., 2006; MOREIRA & FERES FILHO, 2007; HAFFAJEE et al., 2007 e 2008), dando embasamento para a dosagem administrada no presente estudo: 400mg de MTZ e 500mg de AMX 3 vezes ao dia. Essa dosagem está de acordo com a recomendação de Montvale (1992) no *Physicians Desk Reference (Medical Economics Staff)*, de até 1.500 mg/dia de metronidazol para tratar infecções anaeróbias; e da ANVISA (DICIONÁRIO de ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS, 2007), que aprova a utilização de até 1.500 mg/dia de amoxicilina para o tratamento de infecções. O protocolo de duração da administração dos antibióticos por 14 dias, iniciando junto com a RAR, foi

determinado de acordo com os estudos de Haffajee et al. (2007 e 2008) e Matarazzo et al. (2008) . Vale destacar que a utilização desses antibióticos por duas semanas está dentro dos limites biológicos aceitáveis e tem sido utilizada no tratamento de outras infecções, como no caso de úlceras gástricas causadas por *Helicobacter pylori* (UYGUN et al., 2007). Além disso, essa escolha visou disponibilizar a droga no ambiente subgengival pelo máximo de tempo possível em que a RAR estivesse sendo realizada. Para minimizar que o efeito protetor do biofilme diminuísse a ação dos antibióticos os sítios mais profundos foram instrumentados nas primeiras duas semanas do tratamento. O melhor momento para a administração da antibioticoterapia também ainda não está definido em periodontia. Alguns estudos iniciaram a administração dos antibióticos logo após a RAR realizada por quadrantes (LOESCHE et al., 1992; ROONEY et al., 2002; CARVALHO et al., 2004 e 2005) enquanto outros o fizeram concomitantemente ao procedimento mecânico (FERES et al., 2001; HAFFAJEE et al., 2007 e 2008; MATARAZZO et al., 2008). Uma forte razão para iniciar as terapias ao mesmo tempo é a redução drástica e rápida da maioria das espécies bacterianas subgengivais, que parece ser um ponto crucial para provocar uma alteração mais benéfica no perfil microbiológico subgengival (HAFFAJEE et al., 2008).

A utilização de CLX a 0,12% 2 vezes ao dia está de acordo com Eaton et al. (1997) que demonstraram a eficácia deste protocolo de bochecho com CLX na redução do índice de placa e da inflamação gengival. Em relação ao tempo de utilização, diversos autores já haviam utilizado este antimicrobiano de forma prolongada, em períodos que variaram entre 2 meses (QUIRYNEN et al., 2000; FAVERI et al., 2006b), 3 meses (EATON et al., 1997), 4 meses (MAGNUSSON et al., 1984) e 1 ano (CHRISTIE et al., 1998). O presente estudo seguiu o protocolo de Faveri et al. (2006b) e Feres et al. (2009), que propuseram o uso deste antimicrobiano por 2 meses.

Todas as terapias utilizadas no presente estudo levaram a uma melhora no perfil microbiológico subgengival; porém, de forma geral, as associações de tratamentos levaram a efeitos benéficos superiores aos obtidos somente com a RAR. Os patógenos do complexo vermelho foram reduzidos em todos os grupos, inclusive no grupo controle; apesar de que esse grupo foi o que apresentou a menor redução dessas espécies aos 3 e 6 meses de avaliação.

Porém, é importante salientar que as proporções de complexo vermelho observada no grupo controle aos 6 meses (9%) foram semelhantes ou até mesmo inferiores do que em outros estudos que também utilizaram o *checkerboard DNA-DNA hybridization* para avaliação microbiológica (FERES et al., 2009; CARVALHO, 2002), indicando a efetividade da RAR realizada no presente estudo. Quando a CLX foi associada à RAR, essa redução foi mais acentuada (5,9%) do que a obtida com a terapia mecânica somente, especialmente em bolsas inicialmente profundas (Figuras 9 e 11), corroborando com achados de Feres et al. (2009), que também descreveram maiores reduções nos patógenos do complexo vermelho com o uso do bochecho de CLX durante a RAR e no período de cicatrização. As terapias que envolveram a utilização de antibióticos sistêmicos levaram às maiores reduções nas proporções do complexo vermelho. Nas bolsas profundas os grupos que associaram MTZ+AMX e MTZ+AMX+CLX apresentaram proporções significativamente menores dessas espécies em comparação com os demais grupos aos 6 meses. É importante destacar ainda que o grupo que associou todas as terapias (MTZ+AMX+CLX) foi o que apresentou os níveis e as proporções mais baixas das espécies do complexo vermelho, individualmente (Figuras 6, 7 e 9, 10) ou em conjunto (8, 11 e 12), aos 3 e 6 meses pós-RAR, tanto em bolsas inicialmente profundas, quanto nas rasas. Esses resultados são muito importantes e sugerem uma vantagem clínica para a combinação de RAR e MTZ+AMX+CLX, uma vez que essas espécies são intimamente relacionadas com o início e progressão da periodontite crônica e a redução desses patógenos é fundamental para que os níveis de inserção clínica sejam mantidos estáveis ao longo do tempo (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005; HAFFAJEE et al., 2006; TELES et al., 2006).

Em relação ao complexo laranja as mudanças mais discretas ocorreram nos grupos de RAR e MTZ. É interessante observar que em relação a esses patógenos a RAR em combinação com a CLX foi mais efetiva do que em combinação com o MTZ, tanto para as espécies individuais quanto para os complexos, na avaliação de boca toda e em bolsas profundas. Além disso, os efeitos benéficos da RAR+CLX na inibição das espécies do complexo laranja se mostraram semelhante aos observados nos grupos MTZ+CHX, MTZ+AMX, MTZ+AMX+CLX. O único estudo que avaliou detalhadamente os efeitos da



RAR+CLX nos níveis e proporções das espécies do complexo laranja, e comparou com os observados na RAR somente, também descreveu resultados superiores quanto à inibição desses patógenos em indivíduos que bochecharam com CLX por 2 meses (FERES et al., 2009).

No geral, os níveis e as proporções das espécies consideradas compatíveis com o hospedeiro dos complexos azul, roxo, amarelo e verde mantiveram-se estáveis ou aumentaram após as terapias. Porém, nota-se um efeito positivo adicional no aumento das proporções dessas espécies com o uso das quatro terapias associadas. Os indivíduos que receberam RAR associada ao MTZ+AMX+CLX tiveram aumentos significativos nas proporções individuais de *A. gerencseriae* e *A. naeslundii* 2 na avaliação de boca toda e em bolsas inicialmente rasas (Figuras 7 e 10), e das cinco espécies de *Actinomyces* nas bolsas inicialmente profundas. Esses resultados são relevantes, uma vez que essas espécies bacterianas são altamente relacionadas à saúde periodontal (TELES et al., 2006). Os estudos que avaliaram os efeitos da RAR em combinação com bochechos de CLX (FERES et al., 2009) ou com MTZ+AMX (MATARAZZO et al., 2008) também observaram um efeito positivo da CLX ou desses dois antibióticos em aumentar as proporções dos *Actinomyces*. Por outro lado, a RAR somente foi o tratamento que menos aumentou as proporções das espécies benéficas, principalmente nas bolsas inicialmente profundas (Figuras 9 e 11). Os dados relativos às alterações nas espécies compatíveis com saúde são de grande importância, uma vez que não somente a redução dos patógenos, mas também o aumento dessas espécies benéficas é fundamental para que a saúde periodontal seja restabelecida e mantida ao longo do tempo (SOCRANSKY & HAFFAJEE 2005).

Um ponto importante a ser considerado nos resultados aqui apresentados é o efeito das terapias no perfil microbiológico subgingival nas bolsas com PS inicial < 5 mm. Estudos anteriores sugerem que as bolsas rasas de pacientes com periodontite abrigam níveis e proporções bem mais altas de patógenos periodontais do que sítios rasos em pacientes saudáveis (XIMENEZ-FYVIE et al., 2000a). Os dados representados na Figuras 10 e 12 confirmam quantidades elevadas de patógenos periodontais nos sítios rasos de indivíduos com periodontite crônica generalizada. É interessante observar que

mesmo nesses sítios rasos, onde o procedimento de RAR é normalmente considerado mais efetivo, as associações de terapias, especialmente as que incluíram antibióticos sistêmicos foram mais efetivas em alterar o perfil microbiológico nesses sítios do que a RAR somente. Aos 6 meses pós-RAR, os patógenos do complexo vermelho somavam menos de 1% da microbiota nos indivíduos que receberam a combinação das quatro terapias, enquanto que no grupo controle esse valor foi de 7,1%.

Apesar do objetivo deste estudo não ter sido descrever os efeitos clínicos decorrentes das diversas terapias, alguns desses dados foram aqui incluídos (Tabela 3 e Figura 5) para evidenciar o fato que as alterações microbiológicas tiveram reflexo direto nos parâmetros clínicos. Porém, os dados clínicos detalhados observados neste estudo foram anteriormente descritas por Mendes (2009). Assim como nos resultados microbiológicos, os resultados clínicos mais positivos foram observados nos grupos MTZ+CLX, MTZ+AMX e MTZ+AMX+CLX, que mostraram o menor percentual de bolsas  $\geq 5$  mm aos 6 meses pós-RAR, seguidos dos grupos CLX e MTZ. O maior percentual de sítios profundos remanescentes foi observado no grupo de RAR. Quando os grupos foram comparados de acordo com os valores de boca toda, o grupo MTZ+AMX+CLX mostrou uma média significativamente menor do que os demais para o parâmetro de NCI. Apesar de significativas, a magnitude das diferenças observadas nas médias de boca toda é pequena. Isso ocorre porque a maioria dos sítios é raso, mesmo em se tratando de periodontite crônica generalizada, e esses sítios normalmente não sofrem alterações profundas nos parâmetros de PS e NCI. Porém, quando os parâmetros de PS e NCI foram avaliados dentro das diferentes categorias de bolsa (Mendes, 2009), nas bolsas intermediárias (PS 4- 6 mm) as maiores reduções em PS, assim como no ganho clínico de inserção foram observados nos grupos MTZ+CLX, MTZ+AMX e MTZ+AMX+CLX; seguidos dos grupos CLX e MTZ; e seguidos do grupo de RAR. Em sítios profundos (PS  $\geq 7$  mm), houve uma redução de aproximadamente 2.3 mm na PS no grupo controle, e de 4 mm no grupo que recebeu as quatro terapias associadas ( $p < 0,05$ ). Já o ganho de inserção clínica foi de 1,9 mm e 3,6 mm, respectivamente. As melhoras clínicas nos parâmetros de PS e NCI para o grupo controle no presente estudo estão acima das médias observadas em diversos outros estudos clínicos. Em uma revisão sistemática

(VAN DER WEIJDEN & TIMMERMAN, 2002) a maioria dos estudos descritos mostrou reduções em PS nos sítios  $\geq 7$  mm entre 0,7 mm e 1,5 mm e no ganho de inserção clínica entre 0,8 mm e 0,9 mm. Esse é um dado importante, pois sugere que os benefícios observados nos grupos teste são vantagens realmente adicionais a um procedimento de RAR bem conduzido. Ou seja, as terapias adjuntas não foram empregadas para compensar um procedimento de RAR pouco efetivo. Esse é um ponto fundamental a ser considerado ao se planejar a associação de terapias, e foi recentemente discutido por Cionca et al. (2009).

Considerando todas as alterações microbiológicas e clínicas aqui descritas pode-se dizer que, de forma geral, as modificações mais benéficas nos parâmetros clínicos e na composição do biofilme subgengival, incluindo reduções nos patógenos e aumento de espécies benéficas foram obtidas com a combinação de RAR+MTZ+CLX, RAR+MTZ+AMX e RAR+MTZ+AMX+CLX, tendo sido observado um benefício adicional para esse último grupo, principalmente devido aos baixíssimos níveis e proporções das espécies do complexo vermelho encontrados nesses indivíduos aos 6 meses de observação. Logo a seguir, poderíamos agrupar as terapias de RAR+CLX e RAR+MTZ, com uma vantagem para o grupo do MTZ na redução dos patógenos do complexo vermelho. Por outro lado, a terapia de RAR+CLX foi mais efetiva em aumentar as proporções das espécies benéficas e reduzir as espécies do complexo laranja, como mencionado anteriormente. A terapia que menos afetou os parâmetros clínicos e a composição da microbiota subgengival foi a de RAR somente.

Estudos que associaram o MTZ à RAR no tratamento da periodontite crônica em geral mostraram resultados clínicos e microbiológicos melhores do que os obtidos somente com a terapia mecânica (JOYSTON-BECHAL et al., 1986; LOESCHE et al., 1992; WINKEL et al., 1997; FERES et al., 2001; HAFFAJEE et al., 2003, 2007 e 2008; CARVALHO et al., 2004 e 2005). Porém, alguns resultados controversos são observados na literatura. Utilizando o checkerboard DNA-DNA hybridization, Feres et al. (2001) observaram um efeito extremamente benéfico na microbiota subgengival da RAR+MTZ até um ano após o tratamento de indivíduos americanos com periodontite crônica moderada. Porém, quando essa terapia foi utilizada em indivíduos brasileiros

com periodontite crônica generalizada os efeitos clínicos e microbiológicos não foram tão profundos quanto se esperava (CARVALHO, 2002; CARVALHO et al., 2004 e 2005). No presente estudo, apesar da combinação de RAR+MTZ ter sido superior à RAR somente, esse efeito foi potencializado quando uma terceira terapia foi associada, seja a CLX ou a AMX. A associação do MTZ e da AMX à RAR também foi previamente avaliada por alguns autores para o tratamento da periodontite crônica. De forma geral os estudos observaram que esta associação de terapias causa benefícios clínicos e microbiológicos, superiores aos observados com a RAR somente (VAN WINKELHOFF et al., 1989 e 1992; EHMKE et al., 2005; PAHKLA et al., 2006; MOEINTAGHAVI et al., 2007; MATARAZZO et al., 2008; CIONCA et al., 2009) ou com a combinação de RAR+MTZ (ROONEY et al., 2002; MATARAZZO et al., 2008). Uma vez que os efeitos no perfil microbiológico da RAR associada ao MTZ ou ao MTZ+AMX ainda não haviam sido diretamente comparados, a discussão desses resultados fica limitada; porém, o benefício da associação desses dois antibióticos na composição da microbiota subgengival já havia sido sugerido em uma população de pacientes fumantes (MATARAZZO et al., 2008).

Finalmente, a terapia que ofereceu as maiores vantagens terapêuticas foi a RAR+MTZ+AMX+CLX. Alguns autores sugeriram anteriormente que os efeitos positivos da RAR ou dos antibióticos sistêmicos no tratamento das periodontites podem ser potencializados com um controle meticuloso do biofilme supragengival durante a fase ativa do tratamento, e que este controle é fundamental para o sucesso em longo prazo do tratamento periodontal (KORNMAN et al., 1994; CARVALHO, 2002; HAFFAJEE et al., 2003b; FERES et al., 2009). Os resultados favoráveis da associação de bochechos de CLX durante e após a fase ativa da terapia podem ser atribuídos a três fatores principais: 1- prevenção da migração de patógenos periodontais do ambiente supragengival para as bolsas recém-raspadas, uma vez que já está bem estabelecido que várias dessas espécies podem colonizar o ambiente supragengival (XIMENEZ-FYVIE et al., 2000b; HAFFAJEE et al., 2008); 2- redução da inflamação nos tecidos periodontais adjacentes, conseqüentemente reduzindo a viabilidade de nutrientes necessários para a multiplicação bacteriana (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002; FERES et al., 2009); 3-

redução de patógenos periodontais em outras superfícies orais, como língua (FAVERI et al., 2006a), saliva e mucosa oral (MAGER et al., 2003).

Por outro lado, a associação dos dois antibióticos empregados também tem importante papel nos resultados benéficos encontrados. O MTZ possui espectro de ação direcionado para bactérias anaeróbias estritas, como é o caso dos três patógenos do complexo vermelho. Uma hipótese que pode explicar o efeito sinérgico da AMX, é que por ser um antibiótico de amplo espectro, a AMX atuaria sobre quase todas as demais espécies subgengivais, ajudando a reduzir rapidamente as contagens totais desses microrganismos. Acredita-se que a redução drástica e rápida da maioria das espécies bacterianas subgengivais seja um ponto crucial para permitir a recolonização dos sítios tratados por colonizadores primários benéficos dos complexos azul, roxo, amarelo e verde, que por sua vez impediriam a recolonização do grupo vermelho (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). O restabelecimento desse perfil microbiológico de saúde periodontal poderia contribuir para a manutenção dos resultados clínicos benéficos, obtidos inicialmente, por longos períodos.

## 7. CONCLUSÕES

1- A associação de terapias à RAR leva a alterações mais benéficas na composição da microbiota subgengival em comparação com a RAR somente.

2- O perfil microbiológico mais compatível com saúde é observado quando a RAR é associada ao MTZ+CHX, MTZ+AMX e, principalmente, ao MTZ+AMX+CLX.

3- Os benefícios microbiológicos obtidos com a associação de CLX ou MTZ à RAR são semelhantes, porém mais discretos do que os observados nos demais grupos teste.

4- Quimioterápicos, locais e sistêmicos, melhoram os efeitos microbiológicos da RAR, especialmente quando usados em combinação, na periodontite crônica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Albandar JM, Germo P, Preus HR. Chlorhexidine use after two decades of over-the-counter availability. *J Periodontol.* 1994;65:109-12.

Araújo 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):84.

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):699-04

Baelum V, Fejerskov O, Manji F. Periodontal diseases in adult Kenyans. *J ClinPeriodontol.* 1988;15:445-52.

Berglundh T, Krok L, Liljenberg B, Westfelt E, Serino G, Lindhe, J. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease A prospective, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 1998 May;25(5):354-62.

Barrett MT. Clinical report upon amoebic pyorrhea. *Dent Cosmos.* 1914a;56:1345-50.

Barrett MT. The protozoa of the mouth in relation to pyorrhea alveolaris. *Dent Cosmos.* 1914b;56:948-53.

Bunting RW Is pyorrhea a local or constitutional disease? *Dent Cosmos.* 1922;64:731-37.

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.

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 Dec; 31(12):1017-76.

Carvalho, LH. Efeitos clínicos e microbiológicos da terapia periodontal básica associada ao metronidazol de uso sistêmico e à profilaxia profissional periódica [dissertação]. Rio de Janeiro: Faculdade de Odontologia - UFRJ; 2002.

Christersson L, Wikesjö U, Albin B, Zambon J, Genco R. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. *J Periodontol.* 1987; 58(8):540-5.

Christie P, Claffey N, Renvert S. The use of 0,2% de chlorhexidine in the absence of a structured mechanical regimen of oral hygiene following the non-surgical treatment of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998;25(1):15-23.

Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombeli A. Amoxicilin and metronidazole as an adjunct to full-mouth scaling and root planning of chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2009 Mar;80(3):364-17.

Clark DC, Shenker S, Stulginski P, Schwartz S. Effectiveness of routine periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole therapy in a sample of mentally retarded adolescents. *J Periodontol.* 1983;54:658-65.

Colombo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, Paster BJ, Smith CM Cugini MA, Socransky SS. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol.*1998;25:169-80.

Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent Jr RL, Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol.* 2000 Jan;27(1):30-6.

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 Jun;20(3):153-6.

Davies AH, McFadzen JA, Squires S. Treatment of Vincent's stomatitis with metronidazole. *Br Med.* 1964 May;1(5391):1149-50.

DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas 2006/07. 35. ed. Rio de Janeiro: EPUC, 2007.

Eaton KA, Rimini FM, Zak E, Brookman DJ, Hopkins LM, Cannell PJ, et al. The effects of a 0.12% chlorhexidine-digluconate-containing mouthrinse versus a placebo on plaque and gingival inflammation over a 3-month period. A multicentre study carried out in general dental practices. *J Clin Periodontol.*1997;24(3):189-97.

Ehmke B, Moter A, Beikler T, Milian E, Flemmig TF. Adjunctive antimicrobial therapy of periodontitis: long-term effects on disease progression and oral colonization. *J Periodontol.* 2005; 76(5): 749-59.

Elter JR, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Meta-analysis of the effect of systemic metronidazole as an adjunct to scaling and root planning for adult periodontitis. *J Periodont Res.* 1997;32(6):487-96.



Ernst CP, Prockl K, Willershausen B. The effectiveness and side effects of 0.1% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses: a clinical study. *Quintessence Int.* 1998;29(7):443-8.

Faveri M, Feres M, Shibli JA, Hayacibara RF, Hayacibara MM, Figueiredo LC. Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans. *J Periodontol.* 2006(a);77(9):1539-46.

Faveri M, Gursky LC, Feres M, Shibli JA, Salvador SL, 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(b);33(11):819-28.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 1983 Jul 1;132(1):6-13.

Feres M, Gursky LC, Faveri M, Tzusuki CO, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2009. In press.

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.* 2001 Jul;28(7):597-09

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.

Fisher JH. Pyorrhea alveolaris: the role of certain microorganisms found in the lesions. *Dent Cosmos.* 1927;69:851-51.

Flemming TF, Milian E, Kopp C, Karch H, Klaiber B. Differential effects of systemic metronidazole and amoxicillin on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in intraoral habitats. *J Clin.Periodontol.* 1998;25:1-10.

Genco RJ, Cianciola L, Rosling B. Treatment of localized juvenile periodontitis. *J Dent Res.* 1981;60(Spec. Issue):527(Abstr. 872).

Gibbons RJ, Berman KS, Knoettner P, Kapsimalis B. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. *Arch Oral Biol.* 1966 Jun;11(6):549-60.

Gibbons RJ, Socransky SS. Enhancement of alveolar bone loss in gnotobiotic mice harbouring human gingival bacteria. *Arch Oral Biol.* 1966 Aug;11(8):847-8.

Gjerme P. Chlorhexidine and related compounds. *J Dent Res.* 1989;68:1602-08.

Glenwright HD, Sidaway DA. The use of metronidazole in treatment of acute ulcerative gingivitis. *Br Dent J.* 1966 Aug 16;121(4):174-7

Goldman H.M. *Periodontal therapy.* St Louis: Mosby. 1968.

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 Sep;77(9):1483-90.

Gonçalves C. Efeitos clínicos e microbiológicos do emprego de tetraciclina local ou sistêmica associada à terapia periodontal básica [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.

Goodson JM, Feres M. Antibiotics and control of plaque-related diseases. In: Newman HN, Wilson J (ed.). *Dental plaque revisited oral, oral biofilms in health and disease.* London: United Kingdom. 1999. p. 549-61.

Gottlieb B. Aetiologie und Prophylaxe der Zahnkaries. *Z Stomatol.* 1921a;129-32.

Gottlieb B. Der Epithelansatz zu Zahne. *Dtsch Monatsschr Zahnheilkd.* 1921b;39:142-47.

Gottlieb B. The formation of the periodontal pocket: diffuse atrophy of the alveolar bone. *J Am Dent Assoc.* 1928;15:462-74.

Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Laurell L, Tonetti MS. Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(10): 1096-107.

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 May;24(5):324-34.

Haffajee AD, Arguello EL, Ximenez-Fyvie LA, Socransky SS. Controlling the plaque biofilm. *Int Dent J.* 2003(a); 53(Suppl 3):191-9.

Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003(b);8(1):115-81.

Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000.* 2006;42: 219-58.

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(3):243-53.

Haffajee AD, Teles RP, Patel MR, Song X, Veiga N, Socransky SS. Factors affecting human supragingival biofilm composition. I. Plaque mass. J Periodontol. 2008 Oct 7.

Harrell V. The present status of Plaut-Vincent's infection. Arch Otolaryngol. 1931;14:1-8

Hartzell TB. Etiology of pyorrhea alveolaris with a simplified treatment. J Am Dent Assoc. 1925;12:1452-67.

Haupt K., Lang FJ. Die marginale paradentitis. Ihre Patologie, Aetiologie, Klinik, Therapie und Prophylaxe. Berlin: H.Meusser. 1927;1-397.

Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planning in periodontitis patients. J Clin Periodontol. 2002; 29 (Suppl 3):136-59.

Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. J Clin Periodontol. 2008 Feb;35(2):106-13.

Hellström MK, Ramberg P, Krok L, Lindhe J. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microflora in human periodontitis. J Clin Periodontol. 1996;23(10):934-40.

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

Hugoson A, Lundgren D, Asklöv B, Borgklint G. Effects of three different dental health preventive programmes on young adult individuals: a randomized, blinded, parallel group, controlled evaluation of oral hygiene behavior n plaque and gingivitis. J Clin Periodontol. 2007 May; 34(5):407-15.

Joyston-Bechal S, Smales FC, Duckworth R. Effect of metronidazole on chronic periodontal disease in subjects using a topically applied chlorhexidine gel. J Clin.Periodontol. 1984;11:53-62.

Joyston-Bechal S, Smales FC, Duckworth R. A follow-up study 3 years after metronidazole therapy for chronic periodontal disease. J Clin Periodontol. 1986 Nov;13(10):944-9.

Keyes PH, Jordan HV. Periodontal lesions in the Syrian hamsters. III. Findings related to an infectious and transmissible component. Arch Oral Biol. 1964 Jul-Aug;32:377-400.

Kornman KS, Newman MG, Moore DJ, Singer RE. The influence of supragingival plaque control on clinical and microbial outcomes following the use of antibiotics for the treatment of periodontitis. J Periodontol.1994;65(9):848-54.

Kolle W. Spirochätenbefunde und Salvarsan bei alveolar-pyorrhoe. *Med Klin.* 1917;3:59-60.

Kritchevsky B., Seguin P. The pathogenesis and treatment of pyorrhea alveolaris. *Dent Cosmos* 1918; 60:781-84.

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

Le Clear T. Method of identification of endamoebae in dry smears. *Dent Cosmos.* 1915;57:1313-13.

Lekovic V, Kenney E.B., Carranza FAJ, Endres B. The effect of metronidazole on human periodontal disease. A clinical and bacteriological study. *J Periodontol.* 1983;54:476-80.

Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol.* 1976;47:1-18.

Lindhe J. Treatment of localized periodontitis. In: Genco RJ, Mergenhagen SE, ed. Host-parasite interactions in periodontal diseases. *Am. Soc. Microbiol.* 1981;381-94.

Lindhe J. Treatment of localized periodontitis. In: Genco RJ, Mergenhagen SE, (ed.). Host-parasite interactions in periodontal diseases. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1982. p. 382–94.

Lindhe J, Liljenberg B. Treatment of localized juvenile periodontitis. Results after 5 years. *J Clin Periodontol.* 1984 Jul;11(6):399-10.

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;13:431-45.

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

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

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):282-9.

Loesche WJ, Giordano JR, Soehren S, Kaciroti N. The nonsurgical treatment of

patients with periodontal disease: results after 6.4 years. *Gen Dent.* 2005;53(4):298-306.

Loesche WJ, Giordano JR, Soehren S, Kaciroti N. The nonsurgical treatment of patients with periodontal disease: results after five years. *J Am Dent Assoc.* 2002;133(3):311-20.

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 May;81(5):533-43.

Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarcz J, Smith BA. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol.* 1992 Feb;19(2):103-12.

Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Morrison EC, Caffesse R, Hujoel PP. Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. *J Periodontol.* 1991 Apr;62(4):247-57.

Loesche WJ, Schmidt E, Smith BA, Caffesse R, Stoll J. Metronidazole therapy for periodontitis. *J Periodontal Res.* 1987 May;22(3):224-6.

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 Jun;55(6):325-35.

Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol.* 1982 Apr;53(4):223-30.

Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *Journal of Dental Research.* 1979;58:2404-241.

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

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

Mager DL, Haffajee AD, Socransky SS. The effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects. *J Clin Periodontol.* 2003 Dec;30(12):1031-7.

Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Kiljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol.* 1984;11(3):193-07.

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 Oct;35(10):885-96.

Mc Coy LC, Wehler CJ, Rich SE, Garcia RI, Miler DR, Jones JA. Adverse events associated with chlorhexidine use: results from the department of veterans affair dental diabetes study. *J Am Dent Assoc.* 2008 Feb;139(2):178-83.

Mendes JA. Raspagem e alisamento radicular associado ao controle químico (local e sistêmico) do biofilme dental no tratamento da periodontite crônica - avaliação clínica [dissertação]. Guarulhos, SP: Universidade Guarulhos; 2009.

Moeintaghavi A, Talebi-ardakani MR, Haerian-ardakani A, Zandi H, Taghipour S, Fallahzadeh H, et al. Adjunctive effects of systemic amoxicillin and metronidazole with scaling and root planing: a randomized, placebo controlled clinical trial. *J Contemp Dent Pract.* 2007 Jul 1;8(5):51-9.

Mombelli A, Brochut P, Plagnat D, Casagni F, Giannopoulou C. Enamel matrix proteins and systemic antibiotics as adjuncts to non-surgical periodontal treatment: clinical effects. *J Clin Periodontol.* 2005 Mar; 32(3):225-30.

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

Montvale, NJ. Medical Economics Co; Physicians' Desk Reference. 46th ed. 1992. 2170-4.

Moreira RM, Feres-Filho EJ. Comparison between full-mouth scaling and root planing and quadrant-wise basic therapy of aggressive periodontitis: 6-month clinical results. *J Periodontol.* 2007 Sep;78(9):1683-8.

Novak MJ, Polson AM, Adair SM. Tetracycline therapy in patients with early juvenile periodontitis. *J Periodontol.* 1988 Jun;59(6):366-72.

Novak MJ, Stamatelakys C, Adair SM. Resolution of early lesions of juvenile periodontitis with tetracycline therapy alone: long term observations of 4 cases. *J Periodontol.* 1991 Oct;62(10):628-33.

[Nyman S, Rosling B, Lindhe J.](#) Effect of professional tooth cleaning on healing after periodontal surgery. *J Clin Periodontol.* 1975 Apr;2(2):80-6.

Pahkla ER, Koppel T, Saag M, Pahkla R. Metronidazole concentrations in plasma, saliva and periodontal pockets in patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005 Feb;32(2):163-6.

Pahkla ER, Koppel T, Naaber P, Saag M, Loivukene K. The efficacy of non-surgical and systemic antibiotic treatment on smoking and non-smoking periodontitis patients. *Stomatologija.* 2006; 8(4):116-21.

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 Feb;21(2):107-12.

Palmer RM, Matthews JP, Wilson RF. Adjunctive systemic and locally delivered metronidazole in the treatment of periodontitis: a controlled clinical study. Br Dent J. 1998;184(11):548-52.

Palmer RM, Matthews JP, Wilson RF. Non-surgical periodontal treatment with and without adjunctive metronidazole in smokers and non-smokers. J Clin Periodontol. 1999 Mar;26(3):158-63.

Printz H. The etiology of pyorrhea alveolaris. Dent.Cosmos 1926;68:1-9.

Quirynen M, Mongardini C, Soete M, Pauwels M, Coucke W, Van Eldere J et al. The role of chlorhexidine in the one stage full-mouth disinfection treatment of patients with advanced adult periodontitis. Long-term clinical and microbiological observations. J Clin Periodontol 2000;27(8):578-89.

Reddy J, Africa CW, Parker JR. Darkfield microscopy of subgingival plaque of an urban black population with poor oral hygiene. J Clin.Periodontol. 1986;13:578-82.

Rosling B, Nyman S, Lindhe J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. J Clin Periodontol. 1976 Feb;3(1):38-53.

Rooney J, Wade WG, Sprague SV, Newcombe RG, Addy M. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. J Clin Periodontol. 2002 Apr;29(4):342-50.

Russel AL. Epidemiology of periodontal disease: a review of the literature. Int Dent J. 1967;17:282-96.

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

Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J: The effect of a chlorhexidine regimen on de novo plaque formation. J Clin Periodontol 2004; 31: 609-614.

Shinn D. Metronidazole in acute ulceration gingivitis. Lancet 1962;1:119.

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 Oct;50(10):495-09.

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

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol.* 1991 Nov;18(10):766-75.

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

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

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

Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin.Periodontol.* 1988;15:440-44.

Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol.Immunol.* 1988;3:1-7.

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

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

Sterry KA, Langeroudi M, Dolby AE. Metronidazole as an adjunct to periodontal therapy with sub-gingival curettage. *Brit. Dent. J* 1985;158:176-78.

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

Söder B, Nedlich U, Jin LJ. Longitudinal effect of non-surgical treatment and systemic metronidazole for 1 week in smokers and non-smokers with refractory periodontitis: a 5-year study. *J Periodontol.* 1999; 70 (7): 761-71.

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

Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986 Nov;13(10):905-11.



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

Uygun A, Kadayifci A, Safali M, Ilgan S, Bagci S. The efficacy of bismuth containing quadruple therapy as a first-line treatment option for *Helicobacter pylori*. *J Dig Dis.* 2007 Nov;8(4):211-5.

Van der Weijden G.A, Timmerman, M.F: A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002. 29(Suppl. 3): 55–71.

van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goené RJ, Abbas F, Winkel EG, De Graaff J. Metronidazole plus amoxycillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1989 Feb;16(2):128-31.

van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, Graaff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-Associated Periodontitis. *J Periodontol.* 1992;63:52-7.

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

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 Nov;56(Suppl 11):67-74.

Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Lindhe J. Significance of frequency of professional tooth cleaning for healing following periodontal surgery. *J Clin Periodontol.* 1983; 10: 148-56.

Williams BL, Osterberg SK, Jorgensen J. Subgingival microflora of periodontal patients on tetracycline therapy. *J Clin.Periodontol.* 1979;6:210-21.

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 Apr;28(4):296-05.

Winkel EG, vanWinkelhoff AJ, Timmerman MF, Vangsted T, vander Velden. Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J Clin.Periodontol.* 1997;24:573-79.

Xajigeorgiou C, Sakellari D, Slini T, Baka A, Konstantinidis A. Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2006; 33(4):254-64.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000(a);27(10):722-32.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS. The effect of repeated supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2000(b); 27(9):637-47.

**ANEXOS****ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE EFEITOS ADVERSOS (CÁPSULAS)**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

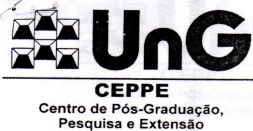
| Marque um <b>X</b> na resposta para cada uma das perguntas abaixo:                                    | <b>SIM</b> | <b>NÃO</b> | <b>NÃO SEI</b> |
|---|------------|------------|----------------|
| 1) Você conseguiu tomar os medicamentos como lhe foi orientado ?                                      |            |            |                |
| 2) Você sentiu algum mal-estar devido ao medicamento que tomou?                                       |            |            |                |
| 3) Sentiu náuseas ou vômito?  |            |            |                |
| 4) Teve diarreia neste período?   |            |            |                |
| 5) Sentiu algum gosto metálico na boca?   |            |            |                |
| 6) Sentiu dor de cabeça ou tontura?   |            |            |                |
| 7) Caso tenha sentido algum dos problemas das perguntas anteriores , isso atrapalhou o seu dia-a-dia? |            |            |                |
| 8) Os medicamentos provocaram mau humor ou irritação?   |            |            |                |
| 09) Sentiu fraqueza ou falta de ânimo para o trabalho?  |            |            |                |
| 10) Teve sono excessivo devido aos medicamentos?  |            |            |                |
| 11) Os horários do medicamento prejudicaram o seu dia-a-dia?  |            |            |                |
| 12) Você tomaria os medicamentos novamente caso fosse necessário?                                     |            |            |                |

**ANEXO B – QUESTIONÁRIO EFEITOS ADVERSOS (BOCHECHOS)**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

| Marque um <b>X</b> na resposta para cada uma das perguntas abaixo: | SIM | NÃO | NÃO SEI |
|--|-----|-----|---------|
| 1) Sentiu gosto metálico na boca?                                  |     |     |         |
| 2) Sentiu sensação de ardência?                                    |     |     |         |
| 3) Percebeu descamação na mucosa?                                  |     |     |         |
| 4) Sentiu alteração de paladar?                                    |     |     |         |
| 5) Seus dentes mancharam?  |     |     |         |
| 6) Sua língua manchou?   |     |     |         |
| 7) O uso do bochecho provocou mau humor?                           |     |     |         |
| 8) Os horários prejudicaram seu dia-a-dia?                         |     |     |         |

## Anexo C - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (UnG).



Guarulhos, 12 de fevereiro de 2007.

Exma. Sra.  
Profa. Luciene Cristina de Figueiredo

### PARECER Nº 15/2007

#### Referência: **Aprovação de Projeto**

**SISNEP/229** - "Efeito clínico e microbiológico da terapia periodontal básica associada ao metronidazol/amoxicilina de uso sistêmico e ao controle químico (clorexidina) do biofilme supragengival em indivíduos com periodontite crônica"

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Efeito clínico e microbiológico da terapia periodontal básica associada ao metronidazol/amoxicilina de uso sistêmico e ao controle químico (clorexidina) do biofilme supragengival em indivíduos com periodontite crônica" - SISNEP/229, na reunião de 05.02.2007, 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 **15.08.2008** e relatório final até **01.03.2009**.

Dumara C. T. Sameshima  
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)